Aus dem Hygiene-Institut der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. med. R.-E. Bader

Die biochemischen Verfahren zur Unterscheidung humaner und boviner Tuberkelbakterien und ihre Anwendbarkeit im diagnostischen Laboratorium

Inaugural-Dissertation

zur
Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
einer
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Werner Runge

aus Zerbst/Anhalt

8047

1964

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547601_0122

Aus dem Hygiene-Institut der Universität Tübingen
Direktor: Prof. Dr. R. E. Bader

Die biochemischen Verfahren zur Unterscheidung humaner und boviner Tuberkelbakterien und ihre Anwendbarkeit im diagnostischen Laboratorium

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Werner Runge
aus Zerbst/Anhalt

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

Dekan: Professor Dr. H. Harms

1. Berichterstatter: Professor Dr. W. Wundt

2. Berichterstatter: Dipl. Chem. Dr. med. habil. H. Uehleke

Inhaltsverzeichnis

	Seite
I. Einleitung und Problemstellung	1
II. Historischer Überblick	
1. Entdeckung der beiden Säugetiertypen des Mycobacterium tuberculosis	2
2. "Umwandlungstheorie" und "Übergangsformen"	4
3. Kriterien zur Typenunterscheidung	5
III. Material und Methoden	
1. Material	9
2. Methoden	
a) Wachstumstyp auf flüssigen und festen Nährböden	9
b) Abhängigkeit der Vermehrungsstärke von Glyzerin und Sauerstoff	10
c) Empfindlichkeit gegen BSH	10
d) Bromkresolpurpur-Nährboden	11
e) Niazinbildungsvermögen	12
f) Nikotinamidaseaktivität	18
g) Nitratreduktaseaktivität	22
h) INH-Sensibilität	23
i) Brenzkatechintest	25
IV. Resultate	
1. Wachstumstyp und Kulturmorphologie	31
2. Glyzerin- und Sauerstoffeinfluß	31
3. BSH-Test	33
4. Bromkresolpurpur-Nährboden	33
5. Niazin-Test	34
6. Nikotinamidase-Test	34
7. Nitratreduktase-Test	35
8. INH-Sensibilität	36
9. Brenzkatechin-Test	36

Seite

V. Diskussion

1. Das Verhalten der Bakterienstämme bei den verschiedenen Verfahren 38

2. Die Bewertung der Verfahren
a) Wachstumstyp, Sauerstoff- und Glyzerinwirkung 39
b) BSH-Test 41
c) Bromkresolpurpur-Nährboden 43
d) Niazin-Test 45
e) Nikotinamidase-Test 47
f) Nitratreduktase-Test 48
g) INH-Resistenzbestimmung 49
h) Brenzkatechin-Test 49
i) Tierversuche 49

VI. Zusammenfassung 51

VII. Literatur-Verzeichnis 53

I. Einleitung

****

Für die Unterscheidung der beiden Säugetiertypen von Mycobacterium tuberculosis, die zur Klärung epidemiologischer Zusammenhänge und versicherungsrechtlicher Fragen von großer praktischer Bedeutung ist, stehen heute zahlreiche Methoden zur Verfügung. Durch die Behandlung Tuberkulosekranker mit Isonikotinsäurehydrazid (INH) und die damit verbundene Heranzüchtung resistenter, virulenzgeschwächter Keime haben die wichtigsten Standardverfahren für die Typendiagnose, die Prüfung des kulturellen Verhaltens und besonders der Tierversuch, an Wert verloren. Nach MEISSNER (1961) treten beim Untersuchungsmaterial von Lungentuberkulosekranken in etwa 24 % der Fälle infolge des Virulenzverlustes Versager im Tierversuch auf, während bei extrapulmonalem Material die Quote geringer ist. Auch Unterschiede in der natürlichen Resistenz gegenüber dem Tuberkuloseerreger sind bei den einzelnen Kaninchensippen zu berücksichtigen (BRAUN 1960, LEBEK 1954). Noch unlängst gab es aus diesen Gründen nicht typisierbare Stämme. In den letzten Jahren sind neue biochemische Unterscheidungsverfahren entwickelt worden, die geeignet sind, bessere Ergebnisse zu liefern und damit Fehlresultate weitgehend zu vermeiden. Sie haben in sehr vielen Tuberkuloselaboratorien Eingang gefunden, und in zahlreichen Arbeiten, auf die später näher eingegangen wird, sind die Autoren nach der Überprüfung der Methoden übereinstimmend zu dem Ergebnis gekommen, daß bei jedem Verfahren Ausnahmen vorkommen, daß aber die Kombination mehrerer Teste falsche Beurteilungen verhindert. Das Ziel der vorliegenden Arbeit soll die Erprobung der Verfahren am Untersuchungsgut des Hygiene-Institutes in Tübingen sein, um die Vor- und Nachteile jedes einzelnen kennenzulernen und zu entscheiden, welche Testmethoden besonders geeignet sind, in der Routinediagnostik Verwendung zu finden.

II. Historisches

Nach der Entdeckung des Tuberkuloseerregers durch ROBERT KOCH 1882 hielt man den Perlsuchtbazillus und den Erreger der menschlichen Tuberkulose für identisch. In einem Vortrage vor der Physiologischen Gesellschaft zu Berlin führte KOCH aus: "Die Perlsucht ist identisch mit der Tuberkulose des Menschen und also eine auf diesen übertragbare Krankheit. Sie ist deswegen ebenso wie andere vom Tier auf den Menschen übertragbare Infektionskrankheiten zu behandeln. Mag nun die Gefahr, welche aus dem Genuß von perlsüchtigem Fleisch oder Milch resultiert, noch so groß oder noch so klein sein, vorhanden ist sie und muß deswegen vermieden werden. .... In Bezug auf die Milch perlsüchtiger Kühe ist es bemerkenswert, daß das Übergreifen des tuberkulösen Prozesses auf die Milchdrüse von Tierärzten nicht selten beobachtet ist, und es ist deswegen wohl möglich, daß sich in solchen Fällen das Tuberkelvirus der Milch unmittelbar beimischen kann." Allerdings wies KOCH schon 1884 in den Mitteilungen aus dem Kaiserlichen Gesundheitsamt auf die Möglichkeit hin, daß sich doch noch Unterschiede herausstellen könnten, die zu einer Trennung führen müßten. TH. SMITH erkannte und beschrieb 1898 die morphologischen Unterschiede, das für die beiden Typen charakteristische Wachstum auf festen Nährböden und die unterschiedliche Virulenz für das Kaninchen, ohne daß dies beachtet oder anerkannt wurde. Es blieb ROBERT KOCH nach umfangreichen Tierversuchen mit SCHÜTZ vorbehalten, das Vorhandensein von zwei Säugetiertypen des Tuberkuloseerregers auf dem Londoner Tuberkulosekongreß im Jahre 1901 bekannt zu geben. Er hatte gefunden, daß sich Rinder dem menschlichen Typ gegenüber sehr widerstandsfähig zeigten, und daß sie nach der Infektion mit dem Keim weiter gut gediehen mit nur geringen Veränderungen an der Eintrittspforte, während der Perlsuchterreger bei kleinsten Infektionsdosen immer eine generalisierte Tuberkulose bei den Tieren hervorrief. Die Übertragbarkeit des

Rindertyps auf den Menschen durch die Milch und deren Produkte wurde 1902 von KOCH und KÖHLER angezweifelt, und 1905 erklärte KOCH in Stockholm, daß es eine generalisierte und eine Lungentuberkulose durch den Typus bovinus nicht gäbe. Nur die Tuberculosis verrucosa cutis der Tierärzte, Fleischer und Schlachthofarbeiter wurde dem Perlsuchterreger zugeschrieben. Auch MOELLER (1902) konnte das Angehen und Weiterwuchern des menschlichen Tuberkuloseerregers im Tierkörper nie beobachten, gleichgültig wie die Rinder und Ziegen infiziert worden waren. Nachdem CORNET 1907 gefunden hatte, daß Tuberkulosebakterien aus Mesenterialdrüsen von erkrankten Kindern für Rinder pathogen waren, kam er zu dem Schluß, daß der Typus bovinus häufiger zu Erkrankungen des Menschen führen müßte. Endlich konnte WEBER 1912 schreiben: "Der Typus bovinus ist imstande, so ziemlich sämtliche Formen der Tuberkulose beim Menschen hervorzurufen. Der Zahl nach bilden allerdings diejenigen Formen, die entweder mit Bestimmtheit oder mit ziemlicher Wahrscheinlichkeit als Fütterungstuberkulose aufzufassen sind - 89 Fälle von Abdominal-, Halsdrüsen- und Tonsillentuberkulose -, die erdrückende Mehrheit." Die Rindertuberkulose stelle also eine ernste Gefahr für die menschliche Gesundheit dar. Da aber die bovinen Keime gegenüber den humanen für Infektionen des Menschen eine untergeordnete Rolle spielten, müßte sich die Bekämpfung der Tuberkulose in erster Linie gegen die Ansteckung von Mensch zu Mensch richten. Dies gilt ohne Einschrankung auch heute noch. Jedoch bleibt hinzuzufügen, daß die extrapulmonalen Tuberkulosen der Kinder und Jugendlichen nach dem Genuß roher Milch und die Tuberkulose der Melker und Tierpfleger nach Inhalation von Tröpfchen oder Stallstaub durch die weitere Sanierung der Rinderbestände und Schutz der sanierten vor erneuter Infektion verhütet werden muß. (KOSSEL 1913, JENSEN 1932, STICKL und KNAPP 1957)

Zweifel am Bestehen der zwei Säugetiertypen des Mycobacterium tuberculosis führten zu Versuchen, die die Möglichkeit einer Umwandlung des einen Typs in den anderen beweisen sollten. PEARSON und

GILLILAND (zit. b. CORNET) nähten beispielsweise humane Tuberkelbakterien, die in Kollodiumsäckchen eingebracht worden waren, in die Bauchhöhle von Rindern ein und beließen sie dort bis zu einem Jahr, ohne daß sie pathogene Eigenschaften für diese Tiere annahmen. WEBER (1912) berichtet über einen Fall von Mittelhandknochentuberkulose, bei dem nach 10 1/2 Jahren immer noch der bovine Typ wie zu Beginn der Erkrankung zu isolieren war. Infolge der Therapie sei die Virulenz abgeschwächt gewesen, aber durch Tierpassagen seien wieder voll virulente bovine Keime erhalten worden. In der gleichen Arbeit wird eine Stellungnahme von STANLEY GRIFFITH zitiert, die auf die Befunde der Englischen Tuberkulosekommission eingeht. Letztere hatte bovine Tuberkelbakterien aus Lupusherden isoliert und gefunden, daß die Keime nach jahre- und jahrzehntelangem Bestehen der Erkrankung ihre Charakteristika beibehalten hatten. GRIFFITH meint: "In my view, and on the facts so far observed, these dysgonic variant viruses are to be regarded as no more than attenuated varieties of the bovine tubercle bacillus just as the eugonic variants are to be regarded as attenuated human tubercle bacilli, and do not stand in any closer relation to the human tubercle bacillus than does the typical bovine tubercle bacillus." Nach dieser scharfen Ablehnung der Umwandlungstheorie kommt WEBER zu dem Schluß, daß die Theorie auf sehr schwachen Füßen stünde und keine Veranlassung geben könnte, von der klaren Trennung der Typen abzusehen. Das Vorhandensein von Übergangsformen, sog. "atypischer Kulturen", hält er für eine treffliche, aber auch eine bequeme Waffe zur Erschütterung der Typentrennung, denn es würden zu oft Kulturen schleunigst als "atypisch" bezeichnet, nachdem der erste Trennungsversuch nicht gelungen sei. In solchen Situationen empfiehlt er ein Vorgehen, das auch heute noch volle Gültigkeit besitzt: "Klappt ein Versuch nicht, so ist er zunächst zu wiederholen und nach allen Richtungen zu erweitern und zu ergänzen. Bei diesem Verfahren, das unter Umständen sehr viel Zeit und Mühe kostet, läßt sich ein großer Teil der "atypischen" Kulturen bei dem

einen oder anderen Typus unterbringen." MÖLLERS (1928) ist der gleichen Ansicht und zitiert PARK und KRUMWIEDE, die 1912 fordern, daß die Zahl der sog. Übergangsformen verringert werden könnte, wenn man zur Typentrennung einfache Methoden, frische Kulturen, ideale Nährböden und eine größere Zahl der Proben benutzte. Abweichungen bezögen sich bei einem reinen Stamm nur auf wenige Merkmale, oder es handele sich um eine Mischkultur. Auch WOLTERS und DEHMEL vertreten in einer Arbeit 1930 die Ansicht, daß es unmöglich sei, durch Tierpassagen den bovinen in den humanen Typ oder umgekehrt zu überführen. STICKL und KNAPP weisen auf Befunde hin, nach denen bei Lupuskranken über Jahrzehnte hinweg hinweg immer nur typisch bovine Stämme gezüchtet werden konnten. Das atypische Verhalten einzelner Stämme läge im Rahmen der natürlichen Variabilität. Wenn bei einem Patienten nach langer Zeit noch ein anderer Typ gezüchtet werden könne, sei dies kein Beweis für eine Umwandlung, sondern ließe besonders an eine Mischinfektion mit beiden Typen denken. Im Schrifttum war bisher kein Fall bekannt, bei welchem anfangs bovine, dann atypische und schließlich humane Tuberkelbakterien isoliert werden konnten. Sehr überraschend waren deswegen die Versuchsergebnisse NASSALS 1961, der humane und bovine Tuberkelbakterien, sowie saprophytische Mykobakterien nach ein bis zwei Tierpassagen in Mycobacterium avium überführt haben will.

Nach welchen Kriterien wurden nun die beiden Typen unterschieden? Verschiedenheiten im Wachstum auf festen Nährböden und in der Virulenz dem Kaninchen gegenüber wurden schon von SMITH 1898 gefunden. Morphologische Unterschiede und verschiedene Wachstumsgeschwindigkeiten beschrieb BECK 1903.

Den Einfluß von Glyzerin auf die beiden Typen fand MOELLER 1902. Während die Vermehrung des humanen Typs auf Glyzerinagar gefördert wurde, trat bei bovinen Keimen eine Hemmung ein.

Die Typendiagnose stützte sich 1903 auf folgende Merkmale (BECK):

1. Morphologie:	Lang, schmal, leicht gekrümmt, Enden dünn	= Typus humanus
	Kurz, dick keulenförmige Enden	= Typus bovinus
2. Koloniemorphologie:	Trockene Oberfläche	= Typus humanus
	Feuchte Oberfläche	= Typus bovinus
3. Glyzerineinfluß:	Fördernd	= Typus humanus
	Hemmend	= Typus bovinus
4. Vermehrungsgeschwindigkeit:	12 bis 14 Tage	= Typus humanus
	3 bis 4 Wochen	= Typus bovinus
5. Vermehrung in flüssigen Nährböden		
	An der Oberfläche und an der Wand emporsteigend	= Typus humanus
	Langsame Vermehrung am Grunde	= Typus bovinus
6. Kaninchentierversuch:	Lokaler Infekt	= Typus humanus
	Generalisation	= Typus bovinus

Die Begriffe eugones = üppiges und dysgones = spärliches Wachstum wurden 1907 von der Englischen Tuberkulosekommission eingeführt (KOSSEL 1913). Typisch eugones Wachstum und Bildung eines gelblichen Pigmentes reichte noch 1932 für die Diagnose Typus humanus aus und machte weitere Untersuchungen überflüssig (JENSEN 1932).

Bereits 1905 fand TH. SMITH das unterschiedliche Säurebildungsvermögen beider Typen. In Fleischbouillon mit 5 % Glyzerin und 1 % Pepton Witte führten bovine Keime zu einem Anstieg des pH-Wertes bis zu einer deutlich alkalischen Reaktion, während die humanen nur in den ersten 14 Tagen eine Verminderung der Azidität aufwiesen, nach 4 Wochen den AnfangspH-Wert wieder erreichten und später deutlich sauer waren (KOSSEL 1913). Bei der Züchtung humaner Stämme auf entrahmter Milch mit 2 % Glyzerin war die Säurebildung so stark, daß die Milch gerann (GRIFFITH zit. b. MÖLLERS 1928). Diese Ergebnisse wurden von WAGENER und MITSCHERLICH 1951 durch die Entwicklung des Bromkresolpurpur-Nährbodens für die Typendiagnose nutzbar gemacht.

Von historischem Interesse ist der Schultz-Dahle'sche Versuch (MÖLLERS 1928). Ein Meerschweinchen wurde 4 Wochen nach der Infizierung mit einem unbekannten Tuberkelbakterienstamm getötet und der Darm des Tieres präpariert. Trat nach dem Aufbringen eines bekannten humanen Teststammes auf den zuvor abgemessenen Darm eine Verkürzung um ein Viertel seiner Länge ein, so sollte dies das Vorliegen eines humanen Stammes beweisen. War keine Reaktion zu sehen oder waren nur normale Darmbewegungen sichtbar, wurde der Typus bovinus diagnostiziert.

Differenzen im Sauerstoffbedarf der zwei Typen wurden von LANGE 1928 beschrieben. Er fand, daß Kulturen, bei denen die Luft durch ein gebogenes Glasrohr Zutritt hatte, stärker bewachsen waren als solche, die mit einem Paraffinverschluß versehen waren. "Mit allem Vorbehalt" weist er darauf hin, "daß hinsichtlich der Tuberkelbazillen-Typen ein gewisser Unterschied der Adaption an Sauerstoff gegeben ist." Während die humanen Keime auf eine optimale Sauerstoffzufuhr eingestellt seien, schienen die bovinen mehr an sauerstoffärmere Medien gewöhnt zu sein. Dieser Befund führte zur Ausarbeitung des Niveau-Agar-Testes durch LEBEK. (BRAUN und LEBEK 1958, LEBEK 1958, 1959 c)

1946 stellten POPE und SMITH in flüssigen Kulturen, in denen sich Tuberkelbakterien nach einer Bebrütung von etwa 4 Wochen vermehrt hatten, einen deutlichen Unterschied in dem Gehalt an B-Komplex-Vitaminen zwischen den humanen und bovinen Kulturen fest, besonders in der Niazinkonzentration. s. Tab. I

Vitamin	Menge / ml der Kulturflüssigkeit H_{37} = Typ. hum.	Ravenel = Typ. bov.
Biotin	0,002 Gamma	0,001 Gamma
Folsäure	0,015 "	0,002 "
p-aminobezoesäure	0,02 "	0,002 "
Thiamin	0,041 "	0,014 "
Riboflavin	0,33 "	0,06 "
Panthotensäure	0,41 "	0,14 "
Pyridoxin	0,44 "	0,09 "
Inositol	14,17 "	1,28 "
Niacin	37,5 "	0,74 "

Tab. I : Die im flüssigen Kulturmedium gebildeten B-Komplex-Vitamine nach POPE und SMITH.

Der Nachweis wurde mikrobiologisch mit Lactobacillus arabinosus ausgeführt. KONNO ersetzte diese sehr genaue, technisch aber schwierige Methode durch die einfache, empfindliche, chemische Reaktion nach KÖNIG (zit. b. BÖNICKE und LISBOA 1958), die aber wegen des giftigen Bromcyans nur in wenigen, mit Luftabzügen ausgestatteten Laboratorien angewandt werden konnte (KONNO 1956, 1958, KONNO et al. 1957, 1958, 1959 b). Das Verdienst BÖNICKEs und LISBOAs (1958) ist es, als Ersatz die ungiftigen Verfahren nach PEKNICE (1956) bzw. nach ASMUS-GARSCHAGEN (1953) vorgeschlagen und dadurch den Test allen Tuberkuloselaboratorien zugänglich gemacht zu haben.

ROTH und Mitarbeiter (1953) beschrieben zuerst das unterschiedliche Verhalten humaner und boviner Stämme gegenüber Thiophen-2-carbonsäurehydrazid (TCH). Sie ermittelten die total hemmende Grenzkonzentration dieser Substanz bei Stamm $H_{37}Rv$ = Typus humanus mit m/1000, während sie bei Stamm Vallee = Typus bovinus weniger als m/100 000 war. BÖNICKE (1958 a, b) untersuchte die Wirkung dieses für den bovinen Typ spezifische Tuberkulosestatikum weiter und entwickelte den TCH- bzw. BSH-Test (Brenzschleimsäurehydrazid) zur Erkennung INH-sensibler boviner Stämme unabhängig von ihrer Virulenz und ihrer sonstigen Chemosensensibilität.

Aufgrund der Fähigkeit des Typus humanus, im Gegensatz zum bovinen Typ größere Mengen eines aromatischen Carbonsäureamides enzymatisch desamidieren zu können, schufen BÖNICKE und LISBOA (1959 b) den Nikotinamidase-Test. Der Nachweis des abgespaltenen Ammoniaks geschieht mit der Reaktion nach RUSSELL (1944).

Das verschieden starke Reduzierungsvermögen von Nitrat zu Nitrit durch Tuberkelbakterien wird in dem 1960 von VIRTANEN veröffentlichten Nitratreduktase-Test zur Unterscheidung der Typen herangezogen.

III. Material und Methoden

Die Untersuchungen wurden an 91 Tuberkelbakterienstämmen ausgeführt, von denen 11 sichere bovine Stämme waren[1]. Die übrigen 80 Stämme waren aus Sputumproben isoliert worden, die aus Kliniken und Heilstätten der Umgebung eingesandt worden waren. Folgende Verfahren wurden zur Typendiagnose benutzt:

1. Feststellung des Wachstumstyps auf festen und flüssigen Nährböden.
2. Abhängigkeit von Glyzerin und Sauerstoff.
3. Empfindlichkeit gegen BSH.
4. Verhalten auf dem Bromkresolpurpur-Nährboden.
5. Niazinbildungsvermögen.
6. Nikotinamidaseaktivität.
7. Nitratreduktaseaktivität.

Außerdem wurden alle Stämme auf ihre INH-Sensibilität geprüft. Bei 20 Stämmen erprobten wir schließlich noch den Brenzkatechin-Test nach VISCHER und TIRUNARAYANAN (1957).

Die Technik der einzelnen Verfahren wird im folgenden näher beschrieben.

Zu 1. Die Wachstumsform auf Löwenstein-Jensen-Nährböden und in modifizierter Lockemannlösung für den Niazintest wurden geprüft. Die Ergebnisse sollten als erster Anhalt für die Typenzugehörigkeit gelten. Eugones Wachstum krümeliger, trockener, gelblicher Kolonien und die Ausbildung eines Oberflächenhäutchens mit Kletterphänomen (WAGNER et al. 1956) auf dem Kondenswasser des festen Nährbodens oder auf dem flüssigen sprachen für den Typus humanus, während dysgones Wachstum feuchtglänzender, glatter, weißer Kolonien bzw. die langsame Ausbildung eines sog.

---

1) Für die freundliche Zusendung boviner Stämme gilt unser Dank Frau Prof. Meissner, Borstel, Herrn Prof. Wagener, Hannover, und Herrn Dr. Nassal, Freiburg.

submersen Häutchens (NASSAL 1961) im flüssigen Nährmedium auf das Vorliegen eines bovinen Stammes schließen läßt. Es wurden von allen Stämmen Subkulturen geprüft. Die Bewertung wurde nach zwei und vier Wochen Bebrütungszeit vorgenommen.

Zu 2. Die Prüfung des Einflusses von Glyzerin und Sauerstoff auf die Vermehrung beider Typen wurde nach dem Vorschlage NASSALs (1961) mit einer Serie von Löwenstein-Jensen-Nährböden (LJ) durchgeführt:

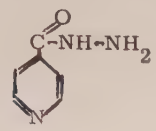
a) LJ mit Glyzerin, mit Sauerstoff
b) LJ mit " , ohne "
c) LJ ohne " , mit "
d) LJ ohne " , ohne "

Die Röhrchen wurden mit Stopfen nach BARTMANN mit und ohne Durchbohrung versehen. Den Sauerstoffbedarf der Keime erkannten wir außerdem am Verhalten im flüssigen Lockemannmedium. Die Kontrolle erfolgte nach vierwöchiger Bebrütung.

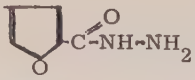
Auf die Erprobung des an sich bewährten Niveau-Agar-Testes nach LEBEK (BRAUN und LEBEK 1958, LEBEK 1958, 1959c), bei dem die zu prüfenden Keime homogen im Medium verteilt werden und die bovinen in einer Tiefe von 12-20 mm eine 1-2 mm breite Vermehrungszone erkennen lassen, während die humanen nur 4-7 mm tief wachsen, wurde verzichtet, da das oben geschilderte Vorgehen zur Materialgewinnung für die weiteren Verfahren geeigneter erschien und in der Ausführung einfacher war. Wie HAIN und GROTH 1956 fanden, ist der LJ-Nährboden dem Petragnani-Nährboden in der Ausbeute überlegen. Er wurde von uns deswegen den anderen festen Medien gegenüber bevorzugt. Von den geprüften Stämmen wurden wieder die ersten Subkulturen benutzt.

Zu 3. TCH bzw. BSH sind typenspezifische Tuberkulostatika, die jedoch wegen der bestehenden Kreuzresistenz zu INH nur auf INH-sensible bovine Stämme hemmend wirken, und zwar in

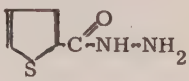
Konzentrationen von 0,1 - 25,0 Gamma / ml Nährboden. Der humane Typ vermehrt sich noch bei 100,0 Gamma / ml gut. (BÖNICKE 1958 a, b).



INH



BSH



TCH

Frisch gelöstes BSH[1)] wurde dem Löwenstein-Jensen-Nährboden mit Malachitgrün vor dem Koagulieren zugesetzt, und zwar in einer Konzentration von 10,0 Gamma / ml Nährboden. Für jeden Stamm legten wir zwei Röhrchen an; der Verschluß erfolgte wiederum mit Bartmann-Stopfen mit bzw. ohne Durchbohrung. Zur Beimpfung der Nährböden wurde eine Bakteriensuspension hergestellt, wie sie vom Deutschen Zentralkomitee für die Bekämpfung der Tuberkulose zur Ausführung von Resistenzbestimmungen vorgeschrieben ist. Nach vier und fünf Wochen wurde abgelesen.

Zu 4. Der Bromkresolpurpurnährboden nach WAGENER gestattete neben der Prüfung der Säurebildung durch einen Tuberkelbakterienstamm auch die Kontrolle seines Wachstumstyps. Er enthält einen hohen Glyzerinanteil von 2,8 %; dafür sind aber die Stickstoffquellen und die Phosphatsalze im Nährmedium stark reduziert. Dies ist nach HENLEY und LE DUC (1939) wichtig, denn je mehr sich das Verhältnis Glyzerin : Stickstoff zugunsten des Glyzerins verändert, umso mehr Säure wird im Nährboden nachweisbar. Die beim Glyzerinabbau durch Oxydation entstehende Säure in Kulturen des Typus humanus wird zunächst

---

1) Herrn Dr. habil. H. Offe, Elberfeld danken wir für die Herstellung und Zusendung von BSH.
BSH wird von der Firma C. Roth, Karlsruhe, Herrenstr. 26/28 hergestellt. 10 g = 25 DM (NASSAL, persönliche Mitteilung vom 20. 7. 1962)

vom Ammoniak, das beim Abbau stickstoffhaltiger Substanzen freigesetzt wird, abgepuffert. Der pH-Wert verschiebt sich in den ersten 14 Tagen daher bei beiden Typen in den alkalischen Bereich. Bald sind aber die Stickstoffquellen verbraucht. Eine Vermehrung findet nicht mehr statt, jedoch atmen die Bakterien noch und vermindern so das Glyzerin weiter. So wird in den humanen Kulturen nach drei bis vier Wochen der Ausgangs-pH-Wert wieder erreicht oder sogar schon zum sauren Bereich hin überschritten. Bei pH = 5,2 schließlich schlägt die Nährbodenfarbe von Graublau nach Gelb um. Die bovinen Stämme lassen den Nährboden lange alkalisch und hellen ihn nach einer Bebrütungsdauer von mehr als acht Wochen geringfügig auf, ohne aber einen Umschlag der Farbe herbeizuführen. Die Luftzufuhr während der Bebrütung muß unbedingt gewährleistet sein. Dies ist ohne Austrocknungsgefahr mit dem durchbohrten Gummistopfen nach BARTMANN, der ein üppiges Wachstum sichert, möglich. Mangelhafte Sauerstoffzufuhr führt bei beiden Typen lediglich zu einer Aufhellung ins Rötlich-Violette und macht den Test wertlos (WAGENER und MITSCHERLICH 1951 a, b, MEISSNER 1959 a, BRAUN 1960, NASSAL 1961). Die Beimpfung wurde mit einer gehäuften Öse Material vorgenommen und Wachstumstyp, sowie Farbumschlag nach vier bzw. sechs Wochen, spätestens nach zwei Monaten Bebrütungsdauer kontrolliert. Auf die Schilderung der etwas aufwendigen Nährbodenherstellung sei verzichtet, zumal der Test seit nunmehr zwölf Jahren erfolgreich in der Typendiagnostik mitwirkt und an technischen Neuerungen nichts hinzuzufügen ist.

Zu 5. Alle Mycobakterien sind der Biosynthese von Nikotinsäure fähig. POPE und SMITH fanden 1946, daß der humane Stamm H37RV fünfzig mal mehr Niazin in der Kulturflüssigkeit angereichert hatte als der bovine Stamm Ravenel. Genaue Messungen von KONNO und Mitarbeitern (1957) ergaben, daß 1 ml

Kulturfiltrat des Typus humanus 13,5 - 32,0 Gamma Niazin enthielt (bei Typus bovinus 1,0 - 1,5 Gamma), und daß 1 mg getrockneter humaner Tuberkelbakterien 6,3 - 12,4 Gamma Niazin bildeten (Typus bovinus 0,3 - 0,5 Gamma). Der Gehalt an Nikotinsäure bei Mycobacterium avium und allen weiteren Mycabakterien bewegte sich in der Größenordnung der Werte des Typus bovinus. Die Virulenz, die INH-Resistenz und die Katalaseaktivität der Stämme war auf das Ergebnis ohne Einfluß. Der anfangs benutzte mikrobiologische Nachweis war für die Nikotinsäure spezifisch, denn der Lactobacillus arabinosus ist wie viele Bakterien nicht imstande, Niazin zu bilden. Niazin ist als funktionelles Glied der Coenzyme (DPN und TPN) für ihn ein essentielles Vitamin (KONNO 1958). Der von KONNO eingeführte chemische Nachweis mit der Reaktion nach KÖNIG war einfacher in der Durchführung, aber wegen des verwendeten flüchtigen Atemgiftes Bromcyan nur in Laboratorien mit Luftabzügen anwendbar. Die chemische Methode weist nur den Pyridinkern nach, ist also für Nikotinsäure unspezifisch. Die sehr geringen Niazinmengen beim Typus bovinus werden hier nicht erfaßt (LEBEK 1959 b). BÖNICKE und LISBOA ersetzten 1958 die KÖNIG-Reaktion durch die chemischen Methoden nach PEKNICE (1956) und nach ASMUS-GARSCHAGEN (1953), die neben ihrer Ungiftigkeit zusätzlich noch den Vorzug einer geringeren Empfindlichkeit haben, also die Gewähr geben, daß nur humane Tuberkelbakterienstämme positive Resultate liefern.

Die Technik der Durchführung hat bei verschiedenen Autoren immer wieder Modifikationen erfahren. KONNO (1958) und KONNO und SBARRA (1959) empfahlen die Verwendung des flüssigen Dubos-Tween-Albumin-Mediums, bei dem der Niazinnachweis schon nach 8 - 14 Tagen Kultivierungszeit ausgeführt werden konnte. MAREK fand 1957, daß von einem guten Niazinbildner mindestens 20 mg Feuchtgewicht notwendig wären, um ein positives Ergebnis zu erhalten. Er hob daher 2-3 volle Bakterienösen von festen Nährböden ab und verrieb sie in den zur KÖNIG-Reaktion notwendigen Reagenzien. Auch vom WAGENER-Nährboden entnommene Bakterien eigneten sich, sofern man ver-

mied, störende Farbstoffanteile mit zu entnehmen. VIRTANEN (1960) brachte nur eine volle Bakterienöse in 0,5 ml 4%-ige alkoholische Anilinlösung und 0,5 ml 10%-ige Bromcyanlösung ein und beobachtete die eventuelle Gelbfärbung bis zu zwei Stunden. JUHLIN (1960) übergoß die Kulturen auf dem Löwenstein-Jensen-Nährboden mit 3 ml physiologischer Kochsalzlösung, erhitzte sie im Dampftopf zwei Stunden lang auf 100°C und wies dann in dem abgegossenen Bakterienextrakt das Niazin nach PEKNICE bzw. nach ASMUS-GARSCHAGEN nach. VISCHER (1961) erzielt mit folgendem Verfahren die besten Resultate: Er bringt auf 3 - 4 Wochen alte Kulturen auf Löwenstein-Jensen-Nährböden 1 ml Aqua dest., läßt sie 1 Stunde stehen und erhitzt sie dann für 1 Stunde im Dampftopf auf 100°C. 3 Tropfen des so gewonnenen Bakterienextraktes werden auf einer Tüpfelplatte mit 1 Tropfen einer 3%-igen alkoholischen Benzidinlösung und 1 Tropfen einer 10%-igen Bromcyanlösung vermischt. Die entstehende Rotfärbung hat nach 30 Minuten ihre größte Intensität erreicht. Das Arbeiten mit Bromcyan hält er für ungefährlich bei Verwendung eines auf die Pipette aufgesetzten Gummiballons, bei geöffnetem Fenster und bei möglichst kurzer Öffnung der Flasche. Im flüssigen Kulturmedium erhielt er mit der Methode nach PEKNICE und ASMUS-GARSCHAGEN weniger eindeutige Ergebnisse.

Wir hielten uns an die Vorschrift von BÖNICKE und LISBOA (1958), die jetzt näher beschrieben werden soll.

Technik:

a) Herstellung des Nährmediums = Modifizierte Lockemannlösung.

Lösung A:	Asparagin	5,0
	KH_2PO_4	3,0
	Na_2HPO_4	3,0
	Natr. citric.	2,5
	Ferriammonsulfat	0,01
	Glukose	1,0
	Natr.-pyruvat	0,5

	Glyzerin	15,0 ml
	Aqua dest. (warm) ad	950,0 ml
	NaOH 10 %	ca. 6,0 ml zur Einstellung des pH-Wertes auf 6,8
Lösung B:	$MgSO_4$	2,5
	Aqua dest.	25,0 ml

Beide Lösungen getrennt sterilisieren 60-70 Min. lang bei 100°C. Danach zusammengeben. Statt einer 20%-igen Eiweißlösung, die teuer und schwer zu beschaffen wäre, verwendeten wir nach dem Vorschlage NASSALs (1961) 25 ml Pferdeserum[1)], die jetzt der Lösung zugesetzt wurden. Abfüllen zu je 5 ml in Reagenzgläser. Verschluß mit Zellstoffstopfen, da nach JUHLIN (1960) Gummistopfen die Niazinbildung negativ beeinflussen sollen. JUHLIN konnte bei Verwendung von Gummiverschlüssen nur bei 6 % der humanen Stämme stark positive Reaktionen erhalten, während bei Metallkappen 78 % stark positiv waren.

b) Beimpfung und Bebrütungsdauer

Die Beimpfung wurde nach der Vorschrift von BÖNICKE mit 5×10^7 Keimen / ml Nährboden vorgenommen. Das Material stammte von Reinkulturen. Wir benutzten eine Platinöse mit einem Durchmesser von 0,36 mm.

Ausgehend von zahlreichen Wiegeversuchen, die ergaben, daß eine normale Platinöse von 2 mm Durchmesser etwa 8,0 mg Bakterien faßt und der Tatsache, daß 1 g Bakterien ca. 10^{12} Keime bei 70-85 % Feuchtigkeitsgehalt enthält (OGINSKY and UMBREIT 1954), wurde nach folgender Rechnung der obengenannte Ösendurchmesser ermittelt:

---

1) Herrn Dr. U. Haakh von der Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere danken wir für die Überlassung von Pferdeblut.

1 g Bakterien = ca. 10^{12} Keime

1 Normalöse von 2 mm Durchmesser = ca. 8 mg Bakterien
= 3,14 mm^2 Fläche

10^{12} Keime = ca. 1 g Bakterien

10^{7} Keime = ca. 0,01 mg Bakterien

25 x 10^{7} Keime = ca. 0,25 mg Bakterien (5 ml Nährboden sind zu beimpfen)

8 mg: 0,25 mg = 3,14 mm^2 ; x

$$8x = 3{,}14 \cdot 0{,}25$$

$$x = \frac{3{,}14 \cdot 0{,}25}{8}$$

$x = 0{,}1\ mm^2$ (Fläche der gesuchten Öse)

$$r^2 = \frac{0{,}1}{3{,}14} = 0{,}0318\ mm^2$$

$r = 0{,}1783$ mm .

D = 0,3566 mm (Durchmesser der gesuchten Öse)

==========

Von jedem Stamm wurden zwei oder drei Röhrchen beimpft. Die Bebrütungsdauer betrug in der Regel 28 Tage. Nur bei wenigen sehr üppig wachsenden Stämmen führten wir den Niazinnachweis schon früher aus. Die bovinen Stämme mit ihrer langsameren Vermehrung machten oft eine Verlängerung der Bebrütungszeit auf fünf Wochen notwendig. Allerdings sollte nicht länger gewartet werden, da sonst die bovinen Tuberkelbakterien infolge einer Niazinanreicherung ein positives Ergebnis verursachen können (GRABENDÖRFER-QUINCKE 1959, NASSAL 1961).

c) Der Nachweis

Der chemische Nachweis der Nikotinsäure in diesem Test ist, wie schon einmal betont, nicht spezifisch für Niazin. Bei positivem Ausfall der folgenden Reaktionen wird lediglich der vorhandene Pyridinring nachgewiesen. Die verwendeten Reagenzien sollten stets frisch hergestellt werden.

Zunächst werden die Kulturen nach Betrachtung ihres Wachstumstyps für zwei Stunden im Dampftopf bei 100°C erhitzt. Damit

werden nicht nur die Bakterien abgetötet, sondern auch das synthetisierte Niazin wird aus dem Zelleib ausgetrieben und so erst dem Nachweis zugänglich gemacht. Die äußerst geringen Niazinmengen, die in der toten Zelle verbleiben, sind nach KONNO (1958) auch bei einer genaueren quantitativen Bestimmung zu vernachlässigen.

Der Nachweis nach PEKNICE:

Das Verfahren wurde 1956 zur Ermittlung des Niazingehaltes in tierischen Organen entwickelt. Niedrigste erfaßbare Konzentration ist 10 Gamma / ml Flüssigkeit.

Von 1%-iger wässriger KCN-Lösung (p.a. MERCK) und 5%-iger wässriger Chloramin-T-Lösung = p-Toluolsulfochloramid-Natrium (p.a. MERCK) je 1 ml der Kulturflüssigkeit zusetzen. Umschütteln. 3-5 Min. bei Zimmertemperatur stehen lassen. Kanariengelbe Verfärbung zeigt Niazin und damit den Typus humanus an. Träger der Farbreaktion ist die 1(p-Toluolsulfonimido)-penten-(2)-5(p-Toluolsulfonamido)-carbonsäure-(4). (BÖNICKE und LISBOA 1958)

Der Nachweis nach ASMUS-GARSCHAGEN:

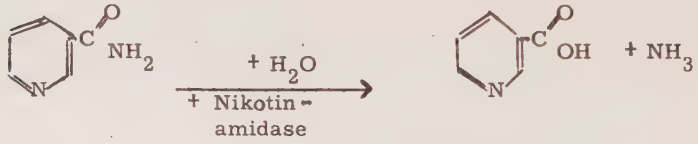
Von 1%-iger wässriger KCN-Lösung (p.a. MERCK) und 5%-iger wässriger Chloramin-T-Lösung (p.a. MERCK) werden der Kulturflüssigkeit je 1 ml zugesetzt. Umschütteln. 3 Min. bei Zimmertemperatur stehen lassen. Zusatz von 3 ml einer 1%-igen wässrigen Barbitursäurelösung (DR. SCHUCHARDT). Umschütteln. 30 Min. bei Zimmertemperatur stehen lassen. Rot- bis Rotviolettfärbung soll Niazin und damit den humanen Typ anzeigen.

Die Farbintensität wurde in drei Graden angegeben.

Nach der Ausführung der Reaktion soll man den Röhrchen einige Tropfen einer 10%-igen Natronlauge zusetzen, um das Entweichen von Blausäuredämpfen im Autoklaven zu verhüten (JENSEN und KIAER zit. i. GRABENDÖRFER-QUINCKE 1959).

Länger aufbewahrte Stämme sollten vor dem Einbringen in das modifizierte Lockemannmedium erst noch einmal auf dem Löwenstein-Jensen-Nährboden frisch angezüchtet werden (GRABENDÖRFER-QUINCKE 1959).

Zu 6. Umfangreiche Untersuchungen über die Amidaseaktivität bei Mycobakterien wurden von BÖNICKE 1957, 1961, 1962 und von BÖNICKE und LISBOA 1959 (a,b) angestellt. Die Ergebnisse dieser Arbeiten sollen hier zusammengefaßt wiedergegeben werden. Fermente, die aromatische und aliphatische Carbonsäureamide hydrolytisch spalten, sind unter den Mycobakterien weit verbreitet. Da sie an Strukturen mit der Formel $RCONH_2$ oder RCONHR angreifen und damit die C-N-Bindung lösen, gehören sie zu der großen Gruppe der Acylamidasen. Eines dieser Fermente ist die Nikotinamidase.



Außer den scotochromogenen atypischen Mycobakterien besitzen alle Mycobakterien das Ferment in unterschiedlicher Stärke, unter den nicht säurefesten Bakterien wurde es nur bei verschiedenen Lactobacillusarten nachgewiesen. Eine sehr hohe Nikotinamidaseaktivität besitzt Mycobacterium smegmatis.

Zwischen dem humanen und dem bovinen Typ des Mycobacterium tuberculosis findet sich ein besonders deutlicher Unterschied in der Fermentaktivität: Typus humanus desamidiert gut, Typus bovinus schlecht. Die INH-resistenten Varianten humaner Tuberkelbakterien desamidieren schneller als die sensiblen Ausgangsstämme. Dieser Effekt wurde beim Typus bovinus nicht beobachtet. Das Wirkungsoptimum des Fermentes liegt bei $42^{\circ}C$ und pH = 7,2 - 7,6, durch einstündiges Erhitzen auf 65 - $70^{\circ}C$

wird es vernichtet. Die modernen Tuberkulostatika hemmen das Enzym nicht, wohl aber Schwermetallionen, besonders Gold, Silber und Quecksilber. Als kompetitive Inhibitoren der Nikotinamidase sind Strukturanaloge des Nikotinamid, wie 3-Cyanpyridin, 3-Acetylpyridin oder Salicylamid, bekannt. Bei Stämmen, die das Ferment nicht oder nur in sehr geringer Menge besitzen, kann die Nikotinamidasebildung nicht durch Passagen auf nikotinsäureamidhaltigen Nährböden induziert oder stimuliert werden; es handelt sich also um ein konstitutives Enzym. Schließlich sei noch die Möglichkeit erwähnt, die Aktivität des Fermentes quantitativ durch die kolorimetrische Bestimmung des noch vorhandenen Nikotinsäureamids in Gegenwart der Nikotinsäure nach Ablauf der Reaktionszeit zu prüfen (LISBOA 1957).

Der Nikotinamidase-Test nach BÖNICKE und LISBOA beruht auf dem Nachweis des Ammoniaks, das von Mycobakterien durch enzymatische Desamidierung von Nikotinsäureamid gebildet wird. Die Bakterienmenge, die Substratkonzentration, der pH-Wert, die Reaktionstemperatur und die Reaktionszeit sind so gewählt, daß der fermentschwache bovine Typ unter diesen Bedingungen negativ bleibt. Für den Versuch sind 30 mg Bakterien, in Ausnahmefällen auch einmal die Hälfte, notwendig, die auf vier Löwenstein-Jensen-Nährböden gezüchtet werden.

Technik (BÖNICKE und LISBOA 1959 b, BÖNICKE 1961):

a) Herstellung der Bakteriensuspension:

Steriles Zentrifugenröhrchen mit etwa 10 ml einer sterilen 0,9%-igen Kochsalzlösung füllen, Beschriften und auf einer Analysenwaage wiegen. Bakterien nach einer Kultivierungszeit von 3 - 5 Wochen unter sterilen Kautelen vom Löwenstein-Jensen-Nährboden abheben und in das Zentrifugengläschen einbringen. Sodann wieder wiegen. Ermittlung des

Bakteriengewichtes durch Subtraktion. 3-maliges Zentrifugieren mit steriler physiologischer Kochsalzlösung für je 10 Minuten bei 3000 U / min, um das evtl. noch an den Bakterien haftende Ammoniak auszuwaschen. Mit m/15 Phosphatpuffer von pH = 7,2 das Sediment im Verhältnis 20 mg Bakterien (Feuchtgewicht) zu 1 ml Puffer wieder lösen. 10 Minuten in sterilem Schüttelkölbchen mit Glasperlen zur Homogenisierung schütteln.

b) Herstellung der Substratlösung:
20 mg Nikotinsäureamid (MERCK) in 100 ml Aqua dest. lösen und 30 Minuten im Dampftopf bei 100°C erhitzen.

c) Versuchsansatz:
Für jeden Stamm 3 sterile Reagenzgläser von I - III numerieren. In jedes Glas 0,5 ml der Bakteriensuspension einbringen (= 10 mg Bakterien). Röhrchen I 30 - 40 Minuten im Dampftopf zur thermischen Inaktivierung des Fermentes bei 100°C erhitzen = Erhitzte Kontrolle (siehe Seite 34). Jedes der drei Gläser erhält jetzt 0,5 ml Substratlösung (= 100 Gamma Nikotinsäureamid). In Röhrchen II sofort danach den Ammoniaknachweis durchführen, um die Garantie dafür zu haben, daß beim Zentrifugieren alles an den Bakterien haftende Ammoniak ausgewaschen wurde = Zeit-O-Kontrolle. Röhrchen I und III werden bei 37°C 7 Stunden lang bebrütet.

d) Ammoniaknachweis nach RUSSELL (1944):
Reagenzien:

$MnSO_4$-Lösung 0,003 molar : 66,9 mg $MnSO_4 + 4\ H_2O$ in 100 ml Aqua dest. lösen.

Phenolreagenz: 25 mg Phenol in 10 ml Aqua dest. lösen. Schütteln. Zusatz von 54 ml 5 n NaOH. Schütteln. Auffüllen ad 100 ml mit Aqua dest. Braune Flasche!

Hypochloritlösung: 25 g Chlorkalk in 300 ml Aqua dest.

heiß lösen. Schütteln. Zusatz von 135 ml einer 20%-igen K_2CO_3-Lösung, die vorher zur Austreibung von NH_3 gekocht wurde. Erhitzen auf 90°C im Wasserbad. Abkühlen. Aqua dest. ad 500 ml. 1 ml der so entstandenen Lösung mit etwas 20%-iger K_2CO_3-Lösung versetzen und wenige Minuten im Wasserbad kochen. Tritt in dieser Probe eine Trübung auf, so sind noch Ca^{++}-Ionen vorhanden, die durch weiteres Hinzufügen von Kaliumkarbonatlösung beseitigt werden müssen. Bleibt die Probe negativ, wird die Lösung filtriert. Sie soll wasserklar sein und 1,3 - 1,4 Gamma freies Cl^- / 100 ml enthalten. Braune Flasche! Kühlschrank!

Nachweis:

In jedes Röhrchen (I, II, III) werden schnell nacheinander 0,2 ml $MnSO_4$-Lösung, 2,0 ml Phenolreagenz und 1,0 ml Hypochloritlösung gegeben. Durchmischen. 15 - 20 Minuten im Wasserbad auf 100°C erhitzen. Blau-Grün-Färbung zeigt den humanen Typ an. Die Farbintensität wird in 3 Graden angegeben.

Bei schwacher Vermehrung der Keime wurde von der Originalvorschrift abgewichen und nach dem Vorschlage BÖNICKEs (1961) die Bakterienmenge auf die Hälfte vermindert, dafür aber die Reaktionszeit verdoppelt. Dies ist bei den beiden Säugetiertypen des Mycobacterium tuberculosis deswegen gut möglich, weil der enzymatische Abbau des Substrates nach einer Reaktion O. Ordnung verläuft, d.h. der Reaktionsverlauf ist linear und die in der Zeiteinheit desamidierten Nikotinsäureamidmengen sind lange konstant. Bei den saprophytischen, atypischen und aviären Mycobakterien ist die in der Zeiteinheit umgesetzte Substratmenge der noch vorhandenen Substratmenge

proportional; es handelt sich um eine Reaktion I. Ordnung (BÖNICKE und LISBOA 1959).

Zu 7. Der Nitratreduktase-Test nach VIRTANEN basiert auf dem quantitativ unterschiedlichen Vermögen der beiden Säugetiertypen des Mycobacterium tuberculosis, angebotenes Nitrat zu Nitrit zu reduzieren. Der humane Typ ist hierzu unabhängig von der Virulenz und der INH-Empfindlichkeit in der Lage, der bovine nicht oder nur ganz schwach. Aviäre und atypische Mycobakterien können beide Reaktionsweisen zeigen. Das Alter der verwendeten Kulturen ist für das Ergebnis wichtig. Sie sollten nicht älter als fünf Wochen sein (VIRTANEN 1960, BOISVERT 1961, VISCHER 1961).

Technik:

a) Reagenzien: I. m/100 $NaNO_3$-Lösung in m/45 Phosphatpuffer pH = 7,0 : 0,085 $NaNO_3$
+0,117 KH_2PO_4
+0,485 $Na_2HPO_4 \cdot 12\ H_2O$
+100 ml Aqua dest.

II. Konzentrierte Salzsäure

III. 0,2%-ige wässrige Sulfanilamid-Lösung

IV. 0,1%-ige wässrige N_1-naphtyl-aethylendiamindihydrochlorid-Lösung.

b) Ansatz: In einem Kahnröhrchen werden 1 - 2 volle Ösen Tuberkelbakterien in einem Tropfen Aqua destillata verrieben, die vom Löwenstein-Jensen-Nährboden entnommen werden. Zusatz von 2 ml Nitratpuffer zur Suspension. Umschütteln. Bebrütung für 2 Stunden bei 37°C. Eine bakterienfreie Kontrolle und ein bekannter, positiv reagierender Stamm werden mitbebrütet.

c) Nachweis: Schnell nacheinander werden jedem Röhrchen 1 Tropfen Reagenz II und je 2 Tropfen Reagenz III

und IV zugegeben. Rot- bis Rotviolettfärbung spricht für den Typus humanus. Die Farbintensität wird in 3 Graden angegeben.

8. Die Prüfung der INH-Sensibilität wurde nach den Bestimmungen des DEUTSCHEN ZENTRALKOMITEES ZUR BEKÄMPFUNG DER TUKULOSE auf dem Hohn-Gottsacker-Nährboden ohne Malachitgrün mit Zusatz von 0,05 , 0,2 , 1,0 und 10,0 Gamma INH/ml Nährboden vorgenommen. Die Vermehrung bzw. die Hemmung der Bakterien wurde nach 14 Tagen und 4 Wochen kontrolliert. Normal empfindliche Stämme wurden durch 0,05 , vermindert empfindliche durch 0,2 , mäßig empfindliche durch 1,0 und resistente durch 10,0 Gamma / ml gehemmt. Die hoch resistenten Keime vermehrten sich auch bei Konzentrationen von 10,0 Gamma / ml Nährboden.

In einer sehr umfangreichen Arbeit hat MEISSNER 1956/57 die Wirkung des INH auf das Mycobacterium tuberculosis untersucht. Die unter der INH-Therapie isolierten Tuberkelbakterien zeichnen sich zunächst durch eine geringere Vitalität aus. Dies beruht auf direkter, reversibler INH-Wirkung, dem Haften und der Schädigung an der Bakterienoberfläche oder der direkten, irreversiblen Wirkung, dem Eindringen des Tuberkulostatikums in das Zellinnere. Die indirekte Wirkung der Substanz besteht in der Selektion sensibilitätsgeminderter oder resistenter Keime. Die geschädigten Bakterien zeigen eine Störung im Lipoid-Komplexaufbau, die den Verlust der Säurefestigkeit zur Folge hat und dem INH das Eindringen in die Zelle gestattet. INH-resistente Mutanten behalten ihre Säurefestigkeit. Im Wachstumstyp kann ein Phasenwechsel von der R- zur S-Form, besonders bei hochresistenten Keimen, auftreten. Nach vielen Kulturpassagen ist aber wieder eugones Wachstum zu erzielen. Im Säurebildungsvermögen wurden ebenfalls reversible Beeinträchtigungen beobachtet. In Mischpopulationen aus INH-resistenten und -sensiblen Tuberkelbakterien gewinnen die sensiblen die Oberhand, während die resistenten wegen ihrer langsameren Vermehrung

überwuchert werden. Kulturversager unter der INH-Behandlung, d.h. nichtangehende Kulturen bei positivem mikroskopischem Befund, sind so zu erklären, daß der Tuberkulöse mit seinem Sputum INH - nach BÖNICKE meist weniger als 5 Gamma / ml, jedoch auch bis zu 50 Gamma / ml (1956/57) - in tuberkulostatisch wirksamer Menge ausscheidet. Hinzu kommt noch Lysozym und bis zu 0,03 % biogenes Wasserstoffsuperoxyd (TSCHESCHE et al. zit. bei BÖNICKE 1956/57). Besonders die resistenten Tuberkelbakterien werden wegen der ihnen fehlenden Katalase stark geschädigt, besonders dann, wenn das Untersuchungsmaterial einige Tage unterwegs ist. Der Zusatz von Antagonisten des INH zum Sputum, wie ihn BÖNICKE vorgeschlagen hat, konnte nach MEISSNER die Quote der Versager nicht verringern. Das klinisch sinnlose Absetzen des Mittels 3 - 6 Tage vor der Entnahme des Sputums ist ebenfalls ohne Erfolg. An Veränderungen im Fermentstoffwechsel der Bakterien sind die Inaktivierung der Katalase und der Peroxydase bei beiden Typen und die Steigerung der Nikotinamidaseaktivität bei Typus humanus zu erwähnen. Außerdem tritt bei den INH-resistenten Varianten keine Hemmung der Atmungsstimulation nach Zusatz von INH gemeinsam mit Natriumsalicylat ein. Beim Versuchstier führen hochresistente Keime zu regressiven Tuberkulosen, d.h. sie sind virulenzgeschädigt und gehen schnell zugrunde. INH-Resistenz, Virulenzschädigung und Kataloseinaktivierung sind erbliche Eigenschaften der einzelnen Bakterien. Nach MEISSNER bedeutet die Virulenzschädigung für den Menschen wahrscheinlich eine größere Ausheilungstendenz, Streuungen unter der Therapie werden vermieden, nur in den Kavernen findet eine ungehemmte Vermehrung der selektionierten Keime statt. Neuinfektionen mit INH-resistenten Stämmen sind bisher nur äußerst selten und nur bei Kindern beschrieben worden, wobei die Keime die gleichen antigenen und immunisatorischen Eigenschaften haben wie sensible und den Patienten vor Superinfektion schützen.

9. Der Brenzkatechintest nach VISCHER und TIRUNARAYANAN (1957, TIRUNARAYANAN und VISCHER 1957) gestattet in einem Arbeitsgang die Beurteilung der Katalase- und der Peroxydase-aktivität.

Die Katalase, ein peroxydspaltendes Ferment, ist bei allen aeroben Bakterien, also auch den Mycobacterien vorhanden. Obligate Anaerobier besitzen keine Katalase. Die folgenden, sehr interessanten Befunde stammen aus Arbeiten BÖNICKES (1956/57, 1956). Die Katalase erfüllt wahrscheinlich eine Schutzfunktion für die Zelle. Die unter biologischen Bedingungen anfallenden Peroxydmengen werden gespalten und der Sauerstoff durch die Peroxydase auf Alkohole in der Zelle übertragen, die dadurch zu Aldehyden werden. Auf optimalen Nährböden ist Katalase für Tuberkelbakterien nicht lebensnotwendig. Katalasefreie Keime zeigen hier eine gute Vermehrung, während sie auf einem Mangelnährboden, der als Stickstoffquelle nur Asparagin enthält, total gehemmt werden. Erst der Zusatz kristalliner Katalase hebt diesen Effekt wieder auf. In gleicher Weise bewirken das auch die katalatisch wirksamen Substanzen Natriumpyruvat, Hämin und Eisenchlorophyllin. Der Verlust der Katalaseaktivität durch eine hohe INH-Resistenz bedeutet also einen höheren Anspruch im Nahrungsmittelbedarf eines Keimes (MEISSNER 1956/57). Bei alten Laboratorium- und BCG-Stämmen ist durch Zusatz von 1 Gamma Hämin / ml Löwenstein-Jensen-Nährboden die Katalaseaktivität zu steigern. Diesen Stämmen ist die Fähigkeit, die prosthetische Gruppe der Katalase in genügender Menge zu synthetisieren, verloren gegangen, und das Hämin vermag diesen Mangel wieder auszugleichen.

MIDDLEBROOK teilte in einer Arbeit 1954 mit, daß INH-resistente Varianten der Tuberkelbakterien ihre Virulenz und ihre Katalaaktivität verlieren. MEISSNER und BÖNICKE bestätigten 1957 diese Befunde mit der Einschränkung, daß unterhalb einer Resistenz

gegen 10 Gamma INH / ml diese Kopplung durchbrochen würde. Es bestehen enge quantitative Beziehungen zwischen der Höhe der Resistenz und der Verminderung der Fermentaktivität. Gegen 10 Gamma INH resistente Tuberkelbakterien sind in der Regel katalasenegativ, gegen 50 und 100 Gamma INH resistente immer. Atypische, aviäre und saprophytäre Mycobakterien, die meist schon primär INH-resistent sind, behalten auch bei einer Resistenz gegen 1000 Gamma INH ihre Katalaseaktivität (BÖNICKE 1954, 1956/57, 1961, MEISSNER 1956/57, MEISSNER und BÖNICKE 1957). Die Kopplung der INH-Resistenz mit dem Verlust der Katalaseaktivität ist also eine charakteristische Eigenart aller Angehörigen der Species Mycobacterium tuberculosis.

Bei INH-resistenten Varianten der Tuberkelbakterien besteht nach BÖNICKE (1956/57) keine Häminheterotrophie, d.h. sie sind noch in der Lage, die prosthetische Gruppe des Fermentes zu synthetisieren, aber sie haben die Fähigkeit verloren, das spezifische Trägerprotein der Katalase zu bilden, die Struktur des Apofermentes muß sich geändert haben. Befunde, die dies unterstreichen, sind einerseits die Nichthemmbarkeit der Katalase von Saprophyten, die hochresistent gegen INH gezüchtet wurden, durch INH und andererseits die höhere Thermoresistenz der Katalase INH-hochresistenter saprophytischer und aviärer Mycobakterien im Vergleich mit den sensibleren Ausgangsstämmen.

Die Katalase INH-sensibler Tuberkelbakterien und der schwach primär resistenten saprophytären und aviären Mycobakterien wird durch die Reaktion des INH mit der prosthetischen Gruppe des Fermentes, dem Protohämin gehemmt; die Katalase adaptierter saprophytärer und aviärer Mycobakterien ist infolge der anderen Struktur der Apofermente nicht hemmbar.

Daß die Katalasehemmung nicht die Ursache der tuberkulostatischen Wirkung ist, wurde eindeutig bewiesen. TIRUNARAYANAN und VISCHER konnten 1956 an einem INH-sensiblen humanen

Stamm zeigen, daß sicher tuberkulostatisch wirksame Konzentrationen bis zu 100 Gamma INH / ml keine Hemmung der Katalase oder der Peroxydase herbeiführten. Erst bei 1000 Gamma trat eine Aktivitätsverminderung ein.

INH ist nur für Mycobakterien ein spezifisches Bakteriostatikum, dagegen ist seine katalasehemmende Wirkung nicht gattungsspezifisch. So kann man beispielsweise mit INH auch die Katalase von Escherichia coli hemmen (BÖNICKE 1956). Das tuberkulostatisch so stark wirkende INH hat von allen Säurehydraziden den schwächsten antikatalatischen Effekt. Nikotinsäurehydrazid und Benzoesäurehydrazid sind schwache Tuberkulostatika, aber starke Katalasehemmer. Die genannten Säurehydrazide sind in Bezug auf die Tuberkulostase Antagonisten des INH im Sinne einer echten kompetitiven Verdrängung. In der antikatalatischen Wirkung jedoch sind sie durch die Addition der Einzelwirkungen Synergisten des INH. Die katalatisch wirksamen Substanzen Hämin, Co-Phthalocyanin, Co- und Fe-Chlorophyllin sind auch tuberkulostatische Antagonisten, aber nicht durch Verdrängung des INH, sondern durch die Oxydation des INH zu Isonikotinsäure im Nährboden (BÖNICKE 1956/57). Ein weiterer Befund, der unterstreicht, daß die Tuberkulostase nicht die Folge einer Katalasehemmung ist, ist der totale Vermehrungsstop von Tuberkelbakterien auf Eiernährböden, die INH in genügend hoher Dosis enthalten. Wie schon oben erwähnt, sind ja gerade katalasefreie Stämme auf diesen Medien gut imstande, sich zu vermehren. Daß das INH keine tuberkulociden Eigenschaften besitzt, konnte BÖNICKE an Tuberkelbakterien zeigen, die noch nach 21 Tagen Einwirkungsdauer des INH durch INH-Antagonisten wie Natriumpyruvat, Hämin usw. "wiederbelebt" werden konnten. Schließlich sei noch erwähnt, daß INH-resistente, katalasenegative Bakterien etwa zehnmal empfindlicher gegen Wasserstoffsuperoxyd sind als sensible Stämme.

In der Durchführung des Katalasetestes hat es verschiedene Modifikationen gegeben, von denen nun einige erwähnt werden sollen: MIDDLEBROOK (1954) mischte 30%-iges H_2O_2 mit 10%-iger Tween-80-Lösung zu gleichen Teilen und brachte einige Kolonien bei 20°C in die Flüssigkeit ein. BÖNICKE (1956/57) gab 1 Tropfen einer Lösung, die aus 30%-igem H_2O_2, m/15 Phosphatpuffer pH = 7,2 und 1,5%-iger Tween-80-Lösung zu gleichen Teilen bestand, auf einen Objektträger und verrieb darin eine gehäufte Öse mit Bakterien. Wenn bis nach 5 Minuten keine Bläschenbildung eintrat, war der Stamm katalasenegativ. VIRTANEN (1960) überschichtete einen genügend bewachsenen Nährboden mit 2 ml 10%-igem H_2O_2 und 2 ml Tween-80-Lösung und wartete eine Schaumbildung ab. BRAUN (1960) gab 3%-iges H_2O_2 auf gut bewachsene Löwenstein-Jensen-Kulturen, die, wenn sie katalaseaktive Bakterien enthielten, Bläschenbildung zeigten. Er führte dieses Verfahren auch an Kulturen aus, die Tuberkulostatika enthielten und bewachsen waren. Trat hier eine Bildung von Bläschen auf, so lag der Verdacht nahe, daß es sich aus oben erwähnten Gründen nicht um echte Tuberkelbakterien handelte. Wir gaben dem Brenzkatechintest nach VISCHER und TIRUNARAYANAN (1957) den Vorzug:

Technik:

a) Reagenzien: I. 0,2 m Acetatpuffer pH = 4,0
II. 2%-ige wäßrige Brenzkatechinlösung
III. 1 : 100 verdünntes Perhydrol (= 30 % H_2O_2)

b) Ausführung: 1 ml Reagenz I, 0,2 ml Reagenz II und 0,1 ml Reagenz III werden in ein Kahnröhrchen gegeben. Darin wird 1 volle Öse Bakterien verrieben. Katalasepositive Keime steigen in wenigen Sekunden an die Oberfläche der Flüssigkeit, katalasenegative bleiben unten.
Peroxydasepositive Keime färben sich innerhalb von 12 Stunden dunkelbraun bis schwarz, peroxydasenegative bleiben ungefärbt.

Die Peroxydase ist ein Ferment, das den von Peroxyden abgespaltenen Sauerstoff auf Alkohole überträgt und diese damit zu Aldehyden oxydiert. Als Sauerstoffakzeptor und Indikator der Peroxydase dient in diesem Test das Brenzkatechin.

c) Bewertung:

Katalasepositiv und Peroxydasepositiv	=	INH-sensible humane und bovine Tuberkelbakterienstämme, bis 1,0 Gamma INH resistente ebenfalls. Von den nicht säurefesten Bakterien nur Candida albicans.
Katalasenegativ und Peroxydasenegativ	=	Für mehr als 10 Gamma INH resistente humane und bovine Tuberkelbakterien.
Katalasepositiv und Peroxydasenegativ	=	Von 1,0 bis 10,0 Gamma INH resistente humane und bovine Tuberkelbakterien. Aviäre und saprophytäre Mycobakterien, sowie alle nicht säurefesten Bakterien.

Zur Unterscheidung der Bakterien in der letzten Gruppe kann die Beobachtung der Vermehrung in Bezug auf die Geschwindigkeit, die optimale Temperatur und das Nährmedium dienen (LEBEK 1959 a). Außerdem stehen zur weiteren Klärung der Niazintest, der Tierversuch und die Bestimmung der Katalasereaktionsstärke nach Warburg zur Verfügung. Der Typus gallinaceus kann durch die Vermehrung auf dem Toluidinblau-Nährboden (NASSAL 1961) und auf Solaktinagar (WAGENER und MITSCHERLICH 1951 b) von den Saprophyten und den echten Tuberkelbakterien abgetrennt werden. Weiterhin ist die Tatsache bedeutungsvoll, daß echte Tuberkelbakterien sich im Gegensatz zu aviären und saprophytären Mycobakterien fast nie auf Nährböden vermehren, die mehr als 100 Gamma p-Aminosalicylsäure (PAS) / ml enthalten. Saprophyten sind schließlich primär

resistent gegen mehr als 100 Gamma Streptomycin pro ml Nährboden, der Typus gallinaceus wird durch 10 Gamma Streptomycin / ml Nährboden in der Vermehrung gehindert (LEBEK 1959 a). Ein positiver Katalasetest nach Resistentzüchtung der zu prüfenden Keime gegen mehr als 50 Gamma INH spricht ebenfalls gegen das Vorliegen echter Tuberkelbakterien (BÖNICKE 1956/57, MEISSNER 1959 b, BÖNICKE 1958 a).

Ein weiterer wertvoller Klassifizierungstest für Tuberkelbakterien ist die Erprobung des Salicylateffektes nach BÖNICKE (1956/57), der auf der Tatsache beruht, daß nur die beiden Typen des Mycobacterium tuberculosis nach Zusatz von Natriumsalicylat ihre Ruheatmung um 60 - 120 % steigern, auch dann, wenn sie gegen INH resistent sind. Der Test ist nur in der Warburg-Apparatur durchführbar und bei positivem Ergebnis beweisend für Tuberkelbakterien (s. auch BÖNICKE 1961).

Für den Brenzkatechintest bleibt noch nachzutragen, daß die Resistenz humaner und boviner Tuberkelbakterienstämme gegen PAS, Streptomycin usw. ohne Einfluß auf die Katalase- oder Peroxydaseaktivität ist. Diese Stämme sind in der Regel positiv. INH-sensible Tuberkelbakterien innerhalb eines INH-resistenten Stammes werden auf folgende Weise erkannt: Nach der Brenzkatechinreaktion werden die Bakterien auf einem Objektträger fixiert und mit Carbolfuchsin gefärbt. Die sensiblen Keime sind dann braun-schwarz, die resistenten leuchtend rot (VISCHER und TIRUNARAYANAN 1957).

IV. Die Resultate

Der verschiedenen Verfahren wurden an insgesamt 91 Tuberkelbakterienstämmen erprobt. 11 davon waren als bovine bekannt; von den unbekannten erwiesen sich 78 als humane und 2 als bovine Stämme. Eine Übersicht über das Material und die Ergebnisse liefert Tabelle II.

1. Der Wachstumstyp und die Kulturmorphologie:
   75 humane Stämme zeigten auf dem festen Löwenstein-Jensen-Nährboden eugones Wachstum gelblich pigmentierter, krümeliger Kolonien, die nach 3 - 4 Wochen einen dichten Bakterienrasen bildeten. Nur 3 Stämme des Typus humanus wuchsen dysgon. Es handelte sich dabei um einen INH-resistenten (K 2754) und zwei hochresistente Stämme (K 1512, K 3439).

   11 der bovinen Stämme wuchsen typisch dysgon, 2 neigten in den weiteren Subkulturen immer mehr zu eugonem Wachstum. Die Kolonien waren weiß, kugelig und hatten eine glatte, feuchtglänzende Oberfläche.

2. Die Abhängigkeit der Bakterienvermehrung von dem Glyzeringehalt des Löwenstein-Jensen-Nährbodens und von der Sauerstoffzufuhr während der Bebrütung:

   Der fördernde Einfluß des Sauerstoffs auf die Vermehrung der humanen Tuberkelbakterien bzw. die bessere Entwicklung der bovinen Typen auf Nährböden, die luftdicht abgeschlossen waren, konnten wir gut erkennen. Das Oberflächenhäutchen als Indikator für einen höheren Sauerstoffbedarf der Bakterien auf dem flüssigen Lockemannmedium und auf dem Kondenswasser des Bromkresolpurpurnährbodens zeigten 65 humane und 1 boviner Stamm. In einigen Fällen beobachteten wir, daß der gleiche humane Stamm nach der Überimpfung auf zwei flüssige Nährböden einmal ein

	Zahl der Stämme	Wachstum auf LJ	Wachstum i. flüss. Nährmedium	O_2-Bedarf	Wagener	Niazin	Nikotinamidase	BSH	Nitratreduktase
Typus humanus	62	eugon	Oberflächenhäutchen + Kletterphänomen	++	Farbumschlag	+++	+++	Vermehrung	+++
	12	eugon	Submerses Häutchen bzw. sehr schwacher Schleier auf der Oberfläche	++	"	+++	++ bis +++	"	+++
	K 2652	schwach eugon	Submerses Häutchen	++	"	(+)	++	"	+
	K 3439	dysgon	zartes Oberflächenhäutchen	++	"	nach Wiederholung ++	+++	"	+++
	K 2754	dysgon	"	++	"	+	++	"	+
	K 1512	dysgon	"	++	kein Farbumschlag	++	+	"	++
Typus bovinus	10	dysgon	Submerses Häutchen	o	kein Farbumschlag	o	o b. 1 Stamm nicht durchführbar	Vermehrung 1 St. =Nr. 2021 gehemmt	o
	Nr. 168	dysgon	"	o	"	+	o	Hemmung	o
	K 6776	dysgon große Kolon.	"	indiff.	"	o	++	"	o
	Nr. 137	eugon	Oberflächenhäutchen + Kletterphänomen	o	"	o	o	"	o

Tab. II : Übersicht über die Ergebnisse

Oberflächenhäutchen bildete, ein anderes Mal nicht. Die drei auf dem festen Nährboden dysgon gewachsenen humanen Stämme ließen das Häutchen an der Oberfläche erkennen, wenn auch der größte Teil der Bakterien am Grunde gewachsen war. Von den bovinen Stämmen bildeten 12 das für den Typ charakteristische submerse Häutchen.

Den Effekt des Glyzerins konnten wir kaum beobachten, was sich mit den Befunden NASSALs (1961) deckt, der die Glyzerinwirkung an Subkulturen auch schlecht zeigen konnte.

3. Alle humanen Stämme vermehrten sich bei 10 Gamma BSH / ml Nährboden ausgezeichnet. Von den 13 bovinen konnten auch nach Wiederholung nur 4 eindeutig gehemmt werden. Es handelte sich dabei um zwei mäßig INH-sensible (Nr. 137, K 6776), einen vermindert sensiblen (Nr. 2012) und einen normal empfindlichen Stamm (Nr. 168). Bei den übrigen, meist hochresistenten bovinen Tuberkelbakterienstämmen konnte auf dem BSH-haltigen Nährboden sogar oft ein stimulierender Effekt gesehen werden.

BSH-Effekt	INH-Sensibilität				
	normal	vermindert	mäßig	resistent	hoch-resistent
Hemmung	1	1	2	-	-
Vermehrung	-	-	-	1	8

Tab. III: Der Effekt des BSH bei den untersuchten bovinen Stämmen und deren INH-Sensibilität

4. Auf dem WAGENER-Nährboden wiesen 77 humane Stämme spätestens sechs Wochen nach der Beimpfung einen deutlichen Farbumschlag nach gelb auf. Ein humaner Bakterienstamm (K1512), der in allen anderen Testen nur mittelstarke Ergebnisse brachte und sich durch dysgones Wachstum auszeichnete, führte auch nach acht Wochen keinen Farbumschlag herbei, obwohl er ausreichend sich vermehrt hatte. Überhaupt fiel auf, daß alle Stämme auf

diesem Nährboden das kräftigste Wachstum zeigten. Verunreinigungen konnten beim Aufrichten der Nährböden aus der Schräglagerung am vierten Tag nach der Beimpfung erkannt und ersetzt werden.

5. Sämtliche humanen Stämme bildeten Niazin in nachweisbaren Mengen, einer jedoch erst nach Wiederholung. Der bovine Stamm Nr. 168 zeigte ein schwach positives Ergebnis. Die Nachweismethode nach ASMUS-GARSCHAGEN erwies sich bei uns als nicht zweckmäßig. Wir erhielten nur bei einem Teil der Stämme eine Rotfärbung, ohne daß die Ursache dafür ermittelt werden konnte. Der Nachweis nach PEKNICE hat keine Schwierigkeiten bereitet und gute Ergebnisse gebracht. Allerdings sind bei der Gelbfärbung die ganz schwach positiven von negativen Resultaten schwer abgrenzbar.

6. Der Nikotinamidase-Test zeigte den Erwartungen gemäß bei den humanen Stämmen positive Resultate. Die bovinen waren bis auf eine Ausnahme (K 6776) negativ. Dieser Stamm brachte auch nach Wiederholung einen deutlich positiven Ausfall der Reaktion.

Mit dem Nikotinsäureamid hatten wir einige Schwierigkeiten: Nachdem der Test anfangs ausgezeichnet durchzuführen war, bekamen wir etwa nach einem halben Jahr sogar bei den negativen Kontrollen und bei den bovinen Stämmen positive Ergebnisse. Es stellte sich schließlich heraus, daß die Substanz sowohl nach RUSSELL als auch nach NESSLER einen so hohen NH_3-Anteil aufwies, daß sie daher für den Test unbrauchbar geworden war. Es empfiehlt sich deshalb, vor Beginn des Versuches das Nikorinsäureamid auf seine Reinheit zu prüfen, zumal uns auch von anderer Seite über ähnliche Vorkommnisse berichtet wurde BÖNICKE 1963),

Die in der Originalvorschrift von BÖNICKE angegebene Zeit von 15 - 20 Minuten zur Inaktivierung des Fermentes im Dampftopf stellte sich bei uns als zu kurz heraus. Selbst nach 30 - 35 Mi-

nuten Erhitzung lieferte der überwiegende Teil der humanen Stämme noch deutlich positive Resultate. Wir empfehlen, entweder die Zeit noch weiter zu verlängern oder ganz auf die "Erhitzte Kontrolle" zu verzichten und bei jeder Testserie einen bekannten positiven und einen negativen Stamm mit zu untersuchen.

7. Im Nitratreduktase-Test waren nach einer Bebrütungszeit von vier Wochen die humanen Stämme stets positiv, die bovinen negativ. Ausnahmen waren nicht zu beobachten.

Da bei der Beschaffung von Sulfanilamid[1)] eine Verzögerung eintrat, konnte der erste Nitritnachweis an schon sieben Wochen alten Kulturen ausgeführt werden anstatt nach vier oder fünf Wochen. Überraschenderweise zeigte sich dabei, daß einige humane Stämme negative, ein Teil der bovinen positive Ergebnisse brachten. Es wurden daher von jedem Stamm noch einmal vier Löwenstein-Jensen-Nährböden beimpft und der Nachweis nach drei, vier, fünf und sechs Wochen Bebrütung bei 37°C vorgenommen. Dabei fanden wir, daß die Nitratreduktaseaktivität der humanen Typen von der dritten zur siebten Woche langsam abfällt, während einige bovine das Ferment anreichern und von der fünften Woche ab schwach positive Reaktionen zeigen können. Am besten geeignet für den Fermentnachweis sind daher übereinstimmend mit anderen Autoren (VIRTANEN 1960, VISCHER 1961) drei bis vier, maximal fünf Wochen alte Kulturen. Vor der vierten Woche ist bei den bovinen Stämmen die Durchführung des Testes wegen der langsameren Vermehrung nicht möglich, bei den humanen Tuberkelbakterienstämmen reichen drei Wochen Kultivierungszeit in der Regel aus. Eine Übersicht gibt Tabelle IV.

---

1) Herrn Dipl.-Chemiker Dr. med. habil. H. Uehleke danken wir für die Hilfe bei der Beschaffung von Sulfanilamid.

Alter der Kulturen	Typ	Farbintensität +++	++	+	Negativ
3 Wochen	T. hum	62	12	4	-
	T. bov.	Noch nicht genügend vermehrt			
4 Wochen	T. hum.	44	28	6	-
	T. bov.	-	-	-	13
5 Wochen	T. hum	30	30	18	-
	T. bov.	-	-	5	8
6 Wochen	T. hum.	15	30	31	2
	T. bov.	-	2	5	6
7 Wochen	T. hum.	2	20	38	18
	T. bov.	-	-	3	10

Tab. IV: Die Abhängigkeit der Farbintensität vom Alter der verwendeten Kultur im Nitratreduktase-Test

8. Die Ergebnisse der INH-Sensibilitätsprüfung können aus der Tabelle V entnommen werden. Dabei fällt auf, daß der überwiegende Teil unserer Stämme resistent bis hochresistent war.

Typ	INH-Sensibilität hoch-resistent	resistent	mäßig sensibel	vermindert	normal empfindl.
T. hum	37	18	9	12	2
T. bov.	8	1	2	1	1

Tab. V: Die INH-Sensibilität der untersuchten Stämme

9. Der Brenzkatechintest nach VISCHER und TIRUNARAYANAN wurde im Gegensatz zu allen vorangegangenen Testen nur an 20 Tuberkelbakterienstämmen ausgeführt und zwar deshalb, weil einer der bovinen Stämme durch den positiven Ausfall des Nikotinamidase-Testes und sein besonders kräftiges Wachstum auf dem WAGENER-Nährboden ohne Farbumschlag verdächtig auf die Beimengung saprophytärer Keime geworden war. Der sehr empfindliche Test

zeigte in dem fraglichen Fall trotz der Resistenz gegen 0,2 Gamma INH positive Katalase- und Peroxydaseaktivität an. Damit war der Beweis für das Vorliegen eines rein mammären Erregers erbracht. Die übrigen mitgeprüften Stämme verhielten sich regelrecht. Ein Stamm, der resistent gegen 10 Gamma INH war, ließ noch eine positive Katalase-Aktivität erkennen. Zur genauen Klärung hätten wir durch Züchtung in Gegenwart von INH eine Resistenz gegen 50 Gamma erzeugen müssen, um dann die Reaktion zu wiederholen.

V. Diskussion

62 humane Stämme zeigten in jedem Test die für diesen Typ charakteristischen Merkmale, 12 konnten aufgrund ihrer Wachstumsform im flüssigen Nährboden nicht erkannt werden; sie verhielten sich aber sonst typengerecht. Der Stamm K 2654 konnte bei sehr schwach positivem Niazintest durch den Nikotinamidase- und den Nitratreduktasetest bestimmt werden. Der Niazintest fiel bei K 3439 zunächst negativ aus, er wurde aber nach Wiederholung positiv. Bei K 1512 handelte es sich um einen sogenannten fermentschwachen Stamm, der wohl im Niazintest positiv, in den anderen biochemischen Testen jedoch nur schwach positiv war und auf dem WAGENER-Nährboden bei ausreichendem Wachstum keine Entfärbung zeigte. Ebenso verhielt sich der Stamm K 2754, der den WAGENER-Nährboden entfärbte und im Nikotinamidasetest positiv war, bei allen anderen Verfahren aber nur äußerst schwach reagierte.

10 bovine Stämme konnten durch dysgones Wachstum, submerses Häutchen, ausbleibenden Farbumschlag im Bromkresolpurpurnährboden, negativen Niazintest, negativen Nikotinamidasetest und negativen Nitratreduktasetest einwandfrei als solche erkannt werden. 9 davon waren als INH-resistente Stämme auf 10 Gamma BSH gewachsen. Ein Stamm (Nr. 2012) war bei verminderter INH-Sensibilität auf BSH in seiner Vermehrung gehemmt. Eine schwach positive Reaktion im Niazintest gab der Stamm Nr. 168; er war normal empfindlich gegen INH, daher auf dem BSH-Nährboden gehemmt und somit als boviner Stamm eindeutig zu identifizieren. Den eugon, mit Kletterphänomen wachsenden Stamm Nr. 137 konnten wir mit allen anderen Nachweismethoden als Typus bovinus identifizieren. Der Stamm K 6776 war mäßig sensibel gegen INH und wurde auf BSH gehemmt; der Nikotinamidasetest zeigte jedoch auch nach Wiederholung einen mittelstark positiven Ausfall. Im Tierversuch bewirkte er bei

Kaninchen und Meerschweinchen eine generalisierte Tuberkulose, wie es dem bovinen Typ entspricht. Auf dem WAGENER-Nährboden war ein sehr kräftiges eugones Wachstum von weit über 100 weißen, glatten Kolonien mit einem Durchmesser von 1 - 1,5 mm ohne Farbumschlag zu beobachten. Da einerseits dieser Befund nie bei den anderen bovinen Keimen erhoben werden konnte und nach MEISSNER (1959 b) verdächtig auf atypische bzw. saprophytäre Mycobakterien ist, andererseits in der Literatur bisher nur ein virulenter boviner Stamm (KONNO et al. 1959) und ein BCG-Stamm (BÖNICKE 1961) als schwach positiv im Nikotinamidasetest beschrieben worden sind, wurde versucht, mit dem Brenzkatechintest eine Klärung herbeizuführen. Hier zeigte sich dann neben der Katalaseaktivität auch die Aktivität der Peroxydase, und wir konnten den Stamm eindeutig als zum Typus bovinus gehörig bezeichnen, denn es war weder eine Niazinbildung noch das Ferment Nitratreduktase trotz reichlicher Vermehrung nachzuweisen.

Zu den einzelnen Verfahren läßt sich folgendes sagen:
Nicht mehr als ein grober Hinweis sind für die Typendiagnose die Prüfung des Wachstumstyps, ferner die Bestimmung des Sauerstoffbedarfs und der Glyzerinwirkung auf dem Löwenstein-Jensen-Nährboden, der sich hierfür besonders gut eignet. Es muß einerseits die Tatsache berücksichtigt werden, daß in Subkulturen sich die Kulturmorphologie und der Sauerstoffbedarf des bovinen Typs dem humanen angleichen kann, und daß andererseits INH-resistente humane Stämme nur spärliche Vermehrung zeigen können. Nach MEISSNER (1959 a) ist daher für die Beurteilung der kulturellen Eigenschaften eines Stammes die Durchführung einer Resistenzbestimmung unerläßlich. WOLTERS und DEHMEL (1930) beschreiben zwei virulente bovine Stämme, die wegen eines ausgesprochenen eugonen Wachstums kulturell nicht, sondern erst im Tierversuch zu identifizieren waren. VISCHER fand 1961, daß die humanen Stämme in der Erstkultur und bei INH-Resistenz auch in den ersten Subkulturen dysgon

wachsen, ebenso war es bei BRAUN (1960), der von 65 humanen Tuberkelbakterienstämmen in der Primärkultur 23 dysgone fand. Die beiden Autoren fordern daher mit MEISSNER (1961) gemeinsam, daß der Wachstumstyp vorzugsweise an Subkulturen beurteilt werden müßte.

Ausnahmen in der Ausbildung eines Oberflächenhäutchens auf flüssigen Nährböden sind beim Typus humanus recht häufig zu sehen. Nach WAGENER und MITSCHERLICH findet es sich bei 60 (1951 b) bis 64 % (1951 a) der humanen Stämme, bovine bilden es außer alten Laborstämmen nie. Das Kletterphänomen (WAGENER et al. 1956) fehlt ebenfalls oft. Im allgemeinen gilt ein Stamm, der die beiden Charakteristika kräftig auszubilden in der Lage ist, als human. Der Typus bovinus vermehrt sich im flüssigen Medium obligat in der Tiefe, er bildet dort außer den alten, häufig überimpften Laborstämmen das sog. submerse Häutchen (NASSAL 1961).

In der Frage des Verschlusses der Kulturröhrchen gibt es eine sehr umfangreiche Literatur. Eine Übersicht darüber findet sich bei WAGENER et al. 1956. Für den Typus humanus wurde ein luftdurchlässiger Stopfen gesucht, der aber der Austrocknung des Nährbodens entgegenwirken sollte. Als brauchbar erwies sich der von WAGENER 1956 empfohlene Gummihohlstopfen, der mit zwei Seidenfäden durchzogen war. Heute ist das Problem mit dem Stopfen nach BARTMANN noch besser gelöst.

Das verschiedene Sauerstoffoptimum bei den Tuberkelbakterien ist von BRAUN (zit. b. LEBEK 1959 c) so erklärt worden: Die Bakterienzelle kann ihre Atmung nicht regulieren. Ist der Sauerstoff bei einem großen Angebot durch das Atemferment aktiviert, wird die Kohlenstoffquelle schnell verbrannt und nicht ökonomisch zum Aufbau von Körpersubstanz und von neuen Individuen verwandt. Aufbaustoffwechsel ist aber nur möglich, wenn die Verbrennung langsam vor sich geht. Dies ist aber für die Bakterienzelle nur durch die Verminderung der Sauerstofftension erreichbar.

Glyzerin wurde ursprünglich nur als hygroskopische Substanz den Kulturen zugesetzt, um das Austrocknen zu verhindern (MÖLLERS 1928). Dabei stellte sich für den humanen Typ ein vermehrungsstimulierender Effekt heraus. HAIN und GROTH hegen 1956 Zweifel an der wichtigen Rolle des Glyzerins in den heutigen komplizierten Nährböden. Sie konnten 12 bovine Stämme über glyzerinhaltige Primärkulturen isolieren und alle humanen Stämme auf glyzerinfreien Medien züchten. NASSAL kam 1961 zu dem Ergebnis, daß für den humanen Tuberkuloseerreger der Sauerstoff wesentlicher sei als das Glyzerin. Auch in unseren Versuchen konnten wir keine eindeutigen Unterschiede in der Vermehrung auf glyzerinhaltigen und -freien Löwenstein-Jensen-Kulturen erkennen.

Ein von WEBER 1912 angegebenes Unterscheidungsverfahren, das er selbst für nicht in allen Fällen zutreffend hielt, sei hier noch kurz erwähnt. Reagenzgläser mit glyzerinfreiem Serum wurden nach der Beimpfung zugeschmolzen. War der Stamm nach einem Jahr noch lebensfähig, so sollte es sich um den bovinen Typ handeln. Der Test berücksichtigte also sowohl den Glyzerin- als auch den Sauerstoffbedarf der beiden Säugetiertypen des Mycobacterium tuberculosis.

Brenzschleimsäurehydrazid in einer Konzentration von 10 Gamma pro ml Löwenstein-Jensen-Nährboden ist zur Erkennung des INH-sensiblen bovinen Typs, besonders bei eugonem Wachstum und Virulenzverlust für das Versuchstier, aber auch des INH-sensiblen, dysgon wachsenden humanen Typs, also allen, von der klassischen Form abweichenden Tuberkelbakterien, von großem diagnostischem Wert (BÖNICKE 1958 a, MEISSNER 1959 a, BRAUN 1960, JUHLIN 1960). 38 BCG-Stämme konnten von BÖNICKE (1958 a) gehemmt werden, womit die genetische Zugehörigkeit zum Typus bovinus bewiesen war. ROTH und Mitarbeiter, denen das Verdienst zukommt, als Erste die spezifisch tuberkulostatische Wirkung des gleichwirksamen TCH erkannt zu haben, konnten den INH-resistenten bovinen Stamm Vallee total mit TCH hemmen, was sie zu dem Schluß führte, daß das TCH an

einer anderen Stelle angreifen müßte als INH (1953). Nach sehr eingehenden Untersuchungen konnte aber BÖNICKE (1958 a) viele Gemeinsamkeiten in der Wirkung von INH, TCH und BCH finden, die dafür sprechen, daß der Wirkungsmechanismus gleich oder sehr ähnlich ist. Zunächst besteht eine nahe chemische Verwandtschaft der Substanzen. Weiterhin kann BSH in der gleichen Weise wie INH mit den Antagonisten Hämin, Natrium pyruvat und Co-Phthalocyanin durch Oxydation des BSH zu Brenzschleimsäure im Nährboden und mit Nikotinsäurehydrazid durch echte kompetitive Verdrängung in seiner Wirkung aufgehoben werden. Schließlich bedeutet BSH-Resistenz auch INH- und TCH-Resistenz, sowie Katalasehemmung.

Nach MEISSNER (1961) sprechen 1 % der INH-sensiblen bovinen Keime nicht auf BSH an. DISSMANN und ZECHNER (1960) erhielten bei 10 Gamma TCH / ml LJ in der Primärkultur bei 13,7 % der Stämme eine Vermehrungshemmung, in der 2. Subkultur nur bei 3 %, wobei nur die letzteren als bovine Stämme anzusprechen waren. Das bedeutet, daß frisch isolierte humane Stämme gegenüber TCH bzw. BSH sensibel sind und aus diesem Grunde Erstkulturen für die Typenunterscheidung mit BSH unbrauchbar sind. Von VISCHER (1961) werden zwei humane Stämme beschrieben, die durch 10 Gamma BSH gehemmt werden. NASSAL (1961) findet bei niedrigeren Konzentrationen als 10 Gamma BSH / ml Nährboden eine vermehrungsstimulierende Wirkung bei bovinen Tuberkelbakterien.

Bei einem Material wie dem unsrigen, das zum überwiegenden Teil aus Heilstätten, Sanatorien und Kliniken, also von bereits anbehandelten Patienten stammt, ist der Wert des Testes eingeschränkt. Die Tabelle VI zeigt den sehr hohen Anteil resistenter Stämme an den in den letzten vier Jahren hier untersuchten Tuberkelbakterienstämmen. Weiterhin wurden jährlich nur 10 - 15 Stämme typisiert, von denen 1 - 3 bovin waren. Bei einem solchen Material kann der Test nur in Ausnahmefällen zur Typendiagnose herangezogen werden.

INH-Sensibilität	1959	1960	1961	1962
Normal sensibel	11 = 4,38%	8 = 2,67%	17 = 5,03%	18 = 4,42%
Vermindert sensibel	44 = 17,53%	45 = 15,0%	55 = 16,27%	75 = 18,43%
Mäßig sensibel	38 = 15,14%	35 = 11,67%	42 = 12,43%	55 = 13,51%
Resistent	83 = 33,07%	61 = 20,33%	60 = 17,75%	76 = 18,67%
Hoch-resistent	75 = 29,88%	151 = 50,33%	164 = 48,52%	183 = 44,96%
Gesamt:	251	300	338	407

Tab. VI: Die INH-Sensibilität der in den Jahren 1959-1962 im Hygiene-Institut Tübingen geprüften Tuberkelbakterienstämme

Bei der Untersuchung mit dem WAGENER-Nährboden bilden nur wenige, gegen INH hochresistente, in der Vermehrung gehemmte humane Stämme Ausnahmen, nach MEISSNER (1961) etwa 1,5 %. Schon WAGENER und MITSCHERLICH (1951 a) wiesen darauf hin, daß der Typus bovinus nach längerer kultureller Fortzüchtung die Charakteristika des humanen - Virulenzverlust, Bildung eines Oberflächenhäutchens und leichte Entfärbung des Bromkresolpurpur-Nährbodens - annehmen kann. Die wichtigste Voraussetzung für das Gelingen ist das richtige Verhältnis von Glyzerin zu Stickstoff im Nährboden und die Fähigkeit der geprüften Bakterien, Glyzerin anzugreifen (WAGENER und MITSCHERLICH 1951 b). Die schlechteste Beurteilung erhielt das Verfahren von SAXER und VONARBURG (zit. b. LEBEK 1954 und VIRTANEN 1960), die es als unbrauchbar ablehnten. Von 20 Tuberkelbakterienstämmen konnten sie durch die Beurteilung der Kulturmorphologie und durch den Tierversuch 9 als humane und 11 als bovine bestimmen. Von den 9 humanen Stämmen entfärbten nur 2 den Nährboden, bei 7 blieb er unverändert. Die bovinen ergaben in 3 Fällen positive und in 8 Fällen negative Resultate. LEBEK (1954)

und STUR (1955) konnten dagegen die Brauchbarkeit der Methode voll bestätigen. Sie erhielten keine Fehlresultate, sofern die Herstellung sorgfältig und die Beimpfung von Reinkulturen her vorgenommen wurden. Der Typus bovinus führte auch nach 8 - 12 Wochen Bebrütungszeit außer einer geringen Abblassung keinen Farbumschlag herbei. STUR sah bei BCG-Stämmen trotz üppiger Vermehrung keinen Umschlag der Nährbodenfarbe. Von sich schlecht vermehrenden Stämmen empfahl er, Subkulturen anzulegen. HAIN und GROTH prüften 519 humane und 12 bovine Stämme. 57 der humanen gaben erst in der 2. oder 3. Subkultur ein positives Ergebnis, 6 gaben trotz einer sehr üppigen Vermehrung keinen Farbumschlag. Dieses Resultat führte die Autoren zu dem Schluß, daß das Arbeiten mit dem WAGENER-Nährboden ein "Gefühl der Unsicherheit" hinterließe. Das mag gelten, wenn man sich auf das Ergebnis nur eines Testes stützt. Der Nährboden ist in seiner Aussagekraft den übrigen biochemischen Unterscheidungsverfahren mindestens ebenbürtig. Zum Schutz vor Verunreinigungen hat NASSAL 1961 mit Erfolg versucht, dem Nährboden 0,04 % Malachitgrün zuzusetzen. Der Untergrund war dann nach dem Farbumschlag blaugrün und die Ränder gelb. Wir beimpften von Reinkulturen und hatten kaum Verunreinigungen aufzuweisen. NASSAL empfahl weiter den Phenolrot-Malachitgrün-Nährboden zur Typendiagnose, der schon auf geringere Säuremengen reagiert und bei pH = 6,8 von Braunrot nach Grün umschlägt. Von STOTTMEIER wurde dieser neue Nährboden geprüft und für gut geeignet befunden (1962). Wir halten einen Nährboden, der weniger empfindlich ist, für stärker in seiner Beweiskraft; der WAGENER-Nährboden verändert erst bei pH = 5,2 seine Farbe. Ein positives Resultat bedeutet hier fast immer: Typus humanus. Wichtig ist die reichliche Beimpfung und der Verschluß mit einem Stopfen, der den Luftzutritt nicht behindert und dennoch der Austrocknung entgegenwirkt, was mit dem Gummistopfen nach BARTMANN gut möglich ist. Die Vermehrung der Bakterien war hier stets so üppig, daß daraus wiederum Schlüsse auf die Typenzugehörigkeit möglich waren. Auf dem Kondenswasser, das

infolge des hohen Feuchtigkeitsgehaltes im Nährboden in großer Menge vorhanden ist, bildeten die humanen Stämme meist das für sie typische Oberflächenhäutchen, das am Glase emporkletterte. Die Herstellung des Nährbodens ist etwas aufwendig, aber die äußerst seltenen Ausnahmen machen ihn nach unseren Erfahrungen im Tuberkuloselaboratorium unentbehrlich.

Eugone humane Stämme bilden stets Niazin, dysgone bovine nicht. Bei 39 INH-sensiblen und 4 INH-resistenten BCG-Stämmen fand BÖNICKE (1956/57) keine Niazinsynthese, aber schon 1957 zeigten bei MAREK 5 von 30 BCG-Stämmen ein positives Ergebnis, bei GRABENDÖRFER-QUINCKE (1959) waren alle positiv, bei BOISVERT (1960) 1 Stamm von 12 und bei BÖNICKE (1961) 2 deutlich und 3 weniger stark von insgesamt 7. Auch eugone bovine Bakterien, die sehr selten vorkommen, können einmal ein positives Resultat wie die BCG-Stämme bringen, jedoch im Vergleich zu einem eugonen humanen Stamm viel schwächer (BRAUN 1960, MEISSNER 1961). Eugones Wachstum bei negativem Niazintest spricht für einen BCG-Stamm. GRABENDÖRFER-QUINCKE (1959) beschreibt einen im Tierversuch sicher bestimmten bovinen Stamm, der nach 5-wöchiger Bebrütung noch negativ, nach 6 Wochen aber positiv war. Sie empfiehlt daher zur Vermeidung einer Niazinanreicherung beim Typus bovinus, nie länger als 5 Wochen mit dem Niazinnachweis zu warten. Während KONNO noch 1956 ein paar Kolonien für ausreichend zur Durchführung des Testes hielt, konnte MAREK (1957) zeigen, daß der Bakterienmenge eine entscheidende Bedeutung zukommt. Für ein deutlich positives Ergebnis benötigte er 20 mg eines guten Niazinbildners. Auf dieser Tatsache beruhen auch die Ausnahmen bei den humanen Tuberkelbakterien - nach MEISSNER (1961) 1 - 2 % aus Sputen isolierter Keime -, die sich infolge hoher INH-Resistenz schlecht vermehren (MEISSNER 1959 a, BRAUN 1960). Zusammenfassend läßt sich also folgendes sagen: Ein stark positives Ergebnis spricht für den Typus humanus, ein negatives Ergebnis bei ausreichender Vermehrung für den Typus bovinus. Ein bei ungenügender Vermehrung negatives

Resultat schließt den humanen Typ nicht aus, und ein schwach positives Resultat bei eugonem Wachstum läßt an einen eugonen bovinen, an einen BCG- oder einen fermentschwachen humanen Stamm denken. Zur weiteren Klärung sind hier der Tierversuch und die übrigen biochemischen Verfahren zu verwenden (LEBEK 1959 b, MEISSNER 1961, GRABENDÖRFER-QUINCKE 1959). Der Test hat nirgends eine schlechte Beurteilung gefunden und stellt eine wertvolle, in jedem Institut durchführbare Bereicherung der Unterscheidungsverfahren dar (BÖNICKE und LISBOA 1958).

Unser Kontrollstamm RV erwies sich als guter Niazinbildner. Der Nachweis des Pyridinkernes nach PEKNICE hat sich bewährt, nicht jedoch die Nachweismethode nach ASMUS-GARSCHAGEN. Dies ist kein Nachteil, denn so werden die schwach positiv reagierenden Stämme nicht erfaßt,und der Test gewinnt an Aussagekraft. An anderen Instituten ist man zu dem gleichen Ergebnis gekommen (BÖNICKE 1963) und verzichtet auf den Nachweis nach ASMUS-GARSCHAGEN. Nach JUHLIN (1960) soll die Ausführung des Testes in flüssigen Nährböden mit zu vielen, fälschlich negativen Resultaten behaftet sein, was er auf das verwendete Eiweiß zurückführt. Von 133 humanen Stämmen waren bei der Verwendung von 0,5 % Ovalbumin nach ASMUS-GARSCHAGEN 102 und nach PEKNICE 14 negativ, bei 5 % Humanserum waren von 161 humanen Stämmen 122 nach ASMUS-GARSCHAGEN und 9 nach PEKNICE negativ. Er versuchte diese Eiweißlösungen deshalb zu verwenden, weil das von BÖNICKE benutzte bovine Albumin relativ teuer und schwer beschaffbar ist. Nach diesen Fehlschlägen empfiehlt er die Abschwemmung des Materials vom festen Nährboden und den direkten Nachweis, was ihm bei 158 humanen Stämmen mit einem 100 % positiven Ergebnis gelungen ist. Wir halten die Befunde JUHLINs für einen weiteren Beweis für die Unzweckmäßigkeit des Nachweises nach ASMUS-GARSCHAGEN. Bei der Verwendung von Pferdeserum nach der Empfehlung NASSALs konnten wir keine Versager feststellen. Ebenso hat sich der Verschluß der Kulturröhrchen mit

Zellstoffstopfen bewährt; die Verwendung von Gummistopfen soll die Niazinsynthese hemmend beeinflussen (JUHLIN 1960). Mit der nach unserer orientierenden Berechnung hergestellten Platinöse waren wir in der Lage, ohne Schwierigkeiten immer etwa gleiche Mengen von Tuberkelbakterien auf das modifizierte Lockemannmedium überimpfen zu können. Wir haben diesem Test den ihm gebührenden Platz in der routinemäßigen Typenbestimmung unseres Tuberkulose-Laboratoriums eingeräumt, und es ist BÖNICKE (1962) zuzustimmen, daß eine Typendiagnose ohne Niazintest heute als technisch mangelhaft angesehen werden muß.

Auch beim Nikotinamidasetest, der wegen seines ungeheuren technischen Aufwandes in der Routinediagnostik kaum angewendet werden kann, gibt es Ausnahmen. KONNO und Mitarbeiter erzielten bei 1 virulenten bovinen Stamm ein schwach positives Ergebnis. Nach BÖNICKE (1961) ist das Verfahren das einzige, mit dem INH-resistente BCG-Stämme mit hoher Niazinbildung zu identifizieren sind. Von 7 BCG-Stämmen war nur einer schwach positiv. VISCHER hält den Test für nicht genügend eindeutig (1961), denn er fand unter 60 humanen Stämmen 6, die der Desamidierung nicht oder nur so schwach fähig waren, daß negative Resultate eintraten. Immerhin hält er bei positivem Ergebnis das Vorliegen des Typus bovinus für ausgeschlossen. Dies konnte mit unserem Stamm K 6776 nicht bestätigt werden, denn wir erhielten mit diesem virulenten bovinen Stamm ein deutlich positives Ergebnis. In ihrer Vermehrung geschädigte Stämme, vor allem boviner Herkunft, lassen sich oft nicht in der notwendigen Menge heranzüchten.. Bei einem Stamm mußten wir aus diesem Grunde ganz auf die Durchführung des Testes verzichten, bei einem anderen wichen wir nach dem Vorschlage BÖNICKEs (1962) von der Originalvorschrift ab, indem wir die Bakterienmenge auf die Hälfte reduzierten und die Reaktionszeit verdoppelten. Die Inaktivierung des Fermentes für die "Erhitzte Kontrolle" gelang uns nicht bei 30 - 35 Minuten im Dampftopf mit Sicherheit. Daher war der größte Teil der "Erhitzten Kontrollen" und der Hauptversuch bei den humanen Typen nach

7-stündiger Bebrütung positiv, während die "Zeit-O-Kontrollen" stets negativ waren. Man wird entweder die Erhitzungszeit weiter ausdehnen oder auf diese Kontrolle verzichten müssen, was bei ständiger Verwendung je eines bekannten negativen und eines positiven Stammes als Kontrolle bedenkenlos geschehen kann. Vor Beginn der Untersuchung empfiehlt sich die Prüfung des Nikotinsäureamides auf Ammoniak nach RUSSELL oder mit NESSLERs Reagenz, da bei uns nach etwa einem halben Jahr die Substanz unbrauchbar geworden war und Fehlresultate auftraten, die hätten vermieden werden können. Es wurde uns empfohlen (BÖNICKE 1963), in der Nähe der Substanz keine Flaschen mit Ammoniak offen stehen zu lassen. Wir werden den Test, der auch nach BRAUN (1960) und MEISSNER (1961) für die Routinediagnostik noch unreif ist, bei solchen Stämmen anwenden, die durch die anderen Verfahren nicht eindeutig zu bestimmen sind.

Der Nitratreduktase-Test nach VIRTANEN ist ebenso wie der oben genannte Niazintest einfach und schnell durchzuführen. Ein negatives Ergebnis spricht in Zusammenhang mit den anderen Merkmalen für den Typus bovinus, der positive Ausfall für den humanen Typ. Stämme, die ein negatives oder nur schwach positives Resultat ergeben, sind keine typischen humanen Stämme (VIRTANEN 1960). Von 750 humanen Stämmen waren bei VIRTANEN 742 stark positiv, 1 schwach positiv und 7 negativ, von 23 bovinen waren 21 negativ und 2 schwach positiv, und von 5 BCG-Stämmen schließlich gaben 4 ein negatives und 1 ein schwach positives Resultat. Aviäre Mycobakterien neigen mehr zu einem negativen Ergebnis - bei BOISVERT (1961) waren von 16 aviären 13 negativ. Die atypischen Mycobakterien nehmen eine Mittelstellung ein, d.h. sie können negative bis stark positive Reaktionen zeigen. Da junge Kulturen die größte Aktivität haben, soll nach VISCHER (1961) der Test nur an maximal 3 Wochen alten Kulturen ausgeführt werden. In unserem Untersuchungsgut waren keine Ausnahmen vorhanden, vorausgesetzt, daß der Versuch an höchstens 5 Wochen alten Kulturen ausgeführt wurde. Die Kombination des Niazintestes mit dem Nitratreduktasetest empfiehlt sich zur Festigung

der Ergebnisse (BOISVERT 1961). Zu seiner leichten Ausführbarkeit kommt noch der Vorteil hinzu, daß von derselben Löwenstein-Jensen-Kultur, von der aus die modifizierte Lockemannlösung für den Niazintest beimpft wird, Material für den Nitratreduzierungsversuch mitentnommen werden kann.

Die Resistenzbestimmung gegen INH gehört mit zur Typendiagnose, besonders dann, wenn der BSH-Test oder der Katalase- bzw. der Brenzkatechintest zum Ausschluß anderer Mycobakterien durchgeführt werden soll.

Der Brenzkatechintest nach VISCHER ist ein technisch leicht durchzuführendes Verfahren zur gleichzeitigen Erkennung der Katalase- und Peroxydaseaktivität. Da er aber von uns erst nur an einer kleinen Anzahl von Stämmen erprobt wurde, kann zu seiner Bedeutung nicht endgültig Stellung genommen werden.

Am Schluß dieses Kapitels soll noch von einem klassischen Typenunterscheidungsverfahren, nämlich dem Tierversuch, die Rede sein. Er ist bis heute nicht zu entbehren, so wünschenswert dies aus vielerlei Gründen wäre. Ist auch die generalisierte Tuberkulose des Kaninchens ein nicht zu entkräftendes Indiz für den Typus bovinus (BRAUN 1960), so sind doch 24 % der Stämme aus pulmonalem Material am Versuchstier nicht typisierbar (MEISSNER 1961). Die Ursachen dafür liegen in der unterschiedlichen Virulenz der Stämme infolge der Chemotherapie und in der ungleichen Empfänglichkeit der einzelnen Tiere begründet (BRAUN und LEBEK 1955). Entscheidend aber ist, daß man nur am Versuchstier in der Lage ist, Mischinfektionen mit humanen und bovinen Erregern zu erkennen, da auf der Kultur letztere von den ersteren überwuchert werden (MEISSNER 1959 a, NASSAL 1961). Aus der Niere der getöteten Tiere ist der bovine Bakterienanteil einwandfrei zu isolieren. Für das Vorgehen bei Mischinfektionen sind auch heute noch die Richtlinien der Englischen Tuberkulosekommission aus dem Jahre 1911 (zit. b. WEBER 1912) voll gültig: "In a mixture of bovine and human tubercle bacilli

separation of the two types of bacillus may be effected in one or other or all of three ways:

1. By passing the culture through the bodies of animals, for example calves and rabbits, which permit the multiplication of the bovine bacillus and resist that of the human bacillus;
2. by subculturing on a glycerin medium which is more favourable to the growth of the human bacillus than to that of the bovine bacillus;
3. by sowing the culture to be tested on the flat surface of a medium on a plate, on which any individual colonies that develop can be seen and separated for investigation."

Bei Material von bereits INH-behandelten Patienten wird es jedoch nach BRAUN (1960) kaum möglich sein, den bovinen Anteil zu erkennen und zu isolieren.

Die biochemischen Verfahren gelten immer noch als Zusatzverfahren, obwohl sie in kombinierter Anwendung einen höheren Aussagewert als die alten Standardverfahren - die Kulturmorphologie, der Wachstumstyp und der Tierversuch haben. Mit ihrer Hilfe werden Stämme, die nicht typisierbar sind, nur noch selten sein unter der Voraussetzung, daß zur Erhöhung der Sicherheit immer mehrere Methoden gleichzeitig angewandt werden, denn: "Sparsamkeit in der Bakteriologie ist der Weg zum Mißerfolg." (ZEISSLER, Hamburg 1946 zit. b. HAIN und GROTH 1956).

VI. Zusammenfassung

An 78 humanen und 13 bovinen Tuberkelbakterienstämmen werden folgende biochemischen Typenunterscheidungsverfahren auf ihre Anwendbarkeit in der Routinediagnostik untersucht:

Der WAGENER-Nährboden,
der Niazintest,
der Nikotinamidasetest,
der Nitratreduktasetest und
der Brenzschleimsäurehydrazid-Nährboden.

Die INH-Sensibilität, der Einfluß von Glyzerin und Sauerstoff auf die Vermehrung der Bakterien und die Kulturmorphologie wurden in weiteren Versuchen ermittelt. An einigen Stämmen wurde schließlich noch der Brenzkatechintest ausgeführt.

Ergebnisse:

1.) Die Beurteilung der Kulturmorphologie und des Einflusses von Glyzerin und Sauerstoff auf Tuberkelbakterien kann zur Typendiagnose nur mit äußerstem Vorbehalt herangezogen werden.
2.) Der Bromkresolpurpur-Nährboden nach WAGENER ist wegen seiner wenigen Versager gut für die Routinediagnostik geeignet.
3.) Auf den Niazintest sollte wegen seiner ebenfalls geringen Versagerquote nirgends mehr verzichtet werden.
4.) Der technisch äußerst schwierige Nikotinamidasetest kann nur in Ausnahmefällen durchgeführt werden.
5.) Der Nitratreduktasetest sollte immer mit dem Niazintest kombiniert Verwendung finden. Seine Ausführung ist leicht, und man benötigt nur eine Ausgangskultur für beide Verfahren.
6.) Der Löwenstein-Jensen-Nährboden mit Zusatz von 10 Gamma BSH / ml Nährboden hat sich bei INH-sensiblen Stämmen ausnahmslos bewährt. Bei einem aus vorwiegend resistenten Stämmen bestehenden Untersuchungsmaterial ist seine Bedeutung jedoch gering.

Meinem verehrten Doktorvater, Herrn Professor Dr. med. W. Wundt, schulde ich besonderen Dank für die Überlassung des Themas zu dieser Arbeit und für seine ständige Bereitschaft, trotz zahlreicher anderer Verpflichtungen mir beratend zur Seite zu stehen.

Die Arbeit soll aber nicht abgeschlossen sein, ohne auf das angenehme Arbeitsklima im Hygiene-Institut Tübingen hingewiesen und den vielen freundlichen med.-techn. Assistentinnen für ihre aktive Mithilfe bei der Herstellung der Nährböden gedankt zu haben.

Literaturverzeichnis

Asmus, E. und Garschagen, H. Über die photometrische Bestimmung von Pyridin in Wasser und Ammoniaklösungen. Zschr. Anal. Chemie 139 : 81-89 (1953)

Beck, M. Beiträge über die Unterscheidung der Bazillen von menschlicher und tierischer Tuberkulose, namentlich nach Infektion verschiedener Tiere. Festschrift zum sechzigsten Geburtstage von Robert Koch, herausgegeben von seinen dankbaren Schülern, Seite 611-624. Gustav Fischer-Verlag Jena 1903

Bönicke, R. Die Katalseaktivität INH-sensibler und -resistenter Mycobakterien und ihre Hemmbarkeit durch INH. Naturwiss. 41 : 430 (1954)

Untersuchungen über die antikatalatische Wirkung des Isoniazids bei Mycobakterien. Zschr. Hyg. Inf. Kr. 142 : 347-362 (1956)

Vergleichende Untersuchungen über den Stoffwechsel der verschiedenen Arten und Varianten der Gattung Mycobacterium. (Möglichkeiten einer Stoffwechselsystematik der Tuberkelbakterien.) Jahresbericht Tuberkulose-Forschungsinstitut Borstel 1956/57, Seite 43-172. Springer-Verlag Berlin, Göttingen, Heidelberg 1957.

Vergleichende Untersuchungen über die enzymatische Desamidierung aromatischer Amide durch isoniazidsensible und -resistente Tuberkelbakterienstämme vom Typus humanus. Naturwiss. 44 : 619 (1957)

Über die tuberkulostatische Wirksamkeit pentaheterocyclischer Carbonsäurehydrazide. Zschr. Hyg. Inf. Kr. 145 : 263-275 (1958) a

Die Differenzierung humaner und boviner Tuberkelbakterien mit Hilfe von TCH. Naturwiss. 45 : 392-393 (1958) b

Die Bedeutung der Acylamidasen für die Identifizierung und Differenzierung der verschiedenen Arten der Gattung Mycobacterium. Jahresbericht Tuberkulose-Forschungsinstitut Borstel 1961, Seite 7-87 Springer-Verlag, Berlin, Göttingen, Heidelberg

Bönicke, R. Identification of Mycobacteria by biochemical methods. Bulletin of International Union against Tuberculosis. June 1962.

Persönliche Mitteilung vom 15.5.1963

Bönicke, R. und Lisboa, B.P. Neuere chemische Verfahren zum Nachweis der Niacinbildung der Tuberkelbakterien und ihre Bedeutung für die Typendifferenzierung. Tuberk. Arzt 12 : 380-386 (1958)

Über das Vorkommen von Acylamidasen in Mycobakterien. I. Mitteilung: Die enzymatische Desamidierung aromatischer und aliphatischer Carbonsäureamide. Zbl. Bakt. I. Orig. 175 : 403-421 (1959) a

Typendifferenzierung der Tuberkulosebakterien mit Hilfe des Nikotinamidase-Testes
Tuberk. Arzt 13 : 377-384 (1959) b

Boisvert, H. L'identification des mycobacteries par la recherche de l'acide nicotinique.
Ann. Inst. Pasteur 99 : 600-607 (1960)

L'identification des mycobacteries par l'epreuve de reduction des nitrates.
Ann. Inst. Pasteur 100 : 352-357 (1961)

Braun, A. Zur Praxis der Typenbestimmung von Mycobacterium tuberculosis.
Zschr. Hyg. Inf. Kr. 147 : 79-93 (1960)

Braun, H. und Lebek, G. Über die Häufigkeit der bovinen extrapulmonalen Infektionen bei Kindern in Bayern.
Med. Mschr. 9 : 399-406 und 477-481 (1955)

Zur Biologie des Typus humanus und bovinus des Mycobacterium tuberculosis.
Zbl. Bakt. I. Orig. 172 : 519-524 (1958)

Cornet, G. Die Tuberkulose.
Alfred Hölder-Verlag, Wien 1907

Dissmann, E. und Zechner, E. Zur Frage der Differenzierung humaner und boviner Tuberkelbakterien mit Hilfe von Thiophen-2-carbonsäurehydrazid (TCH) nach Bönicke. Zschr. Hyg. Inf. Kr. 146 : 210-214 (1960)

Grabendörfer-Quincke, E. Die Brauchbarkeit des Niacintestes nach Peknice in der Modifikation von Bönicke und Lisboa. Differenzierung von Tuberkelbakterien vom Typus humanus.
Beitr. Klin. Tuberk. 120 : 150-156 (1959)

Griffith, A.S. zit. in Jensen, K.A. Reinzüchtung und Typenbestimmung von Tuberkelbazillenstämmen. Zbl. Bakt. I. Orig. 125 : 222-239 (1932)

Hain, E. und Groth, K. Zur Leistungsfähigkeit von Kulturverfahren in der Tuberkulosediagnostik. Beitr. Klin. Tuberk. 115 : 282-302 (1956)

Henley, R.R. and LeDuc, P.W. Growth and metabolism of tubercle bacilli. Am. Rev. Tuberc. 40 : 313-335 (1939)

Juhlin, I. Methods for the grouping and typing of mycobacteria. 2. Differentiation of Mycobacterium tuberculosis into typus humanus and typus bovinus. Acta Path. Microbiol. Scand. 50 : 188-194 (1960)

Koch, R. Die Ätiologie der Tuberkulose. Nach einem in der Physiologischen Gesellschaft zu Berlin am 24. März 1882 gehaltenen Vortrage. Koch, Gesammelte Werke, Bd. I, Seite 428-445 Georg Thieme-Verlag, Leipzig 1912

Über die Ätiologie der Tuberkulose. Aus Verhandlungen des Kongresses für innere Medizin. Erster Kongreß, Wiesbaden 1882. Koch, Gesammelte Werke, Bd. I, Seite 446-453 Georg Thieme-Verlag, Leipzig 1912

Die Ätiologie der Tuberkulose. Mitteilungen aus dem Kaiserlichen Gesundheitsamt 1884, Bd. II, Berlin. Koch, Gesammelte Werke, BdI, Seite 467-565 Georg Thieme Verlag Leipzig 1912

Die Bekämpfung der Tuberkulose unter Berücksichtigung der Erfahrungen, welche bei der erfolgreichen Bekämpfung anderer Infektionskrankheiten gemacht sind. Vortrag, gehalten auf dem Britischen Tuberkulosecongress am 23.6.1901 in London. Dtsch. Med. Wschr. 27 : 549-554 (1901)

Die Übertragbarkeit der Rindertuberkulose auf den Menschen. Vortrag, gehalten auf der Internationalen Tuberkuloseconferenz zu Berlin gelegentlich der Diskussion über das obengenannte Thema. Dtsch. Med. Wschr. 28 : 857-862 (1902)

Über den derzeitigen Stand der Tuberkulosebekämpfung. Nobel-Vorlesung, gehalten in Stockholm am 12. Dezember 1905 Koch, Gesammelte Werke, Bd. I, Seite 612-619 Georg Thieme-Verlag, Leipzig 1912.

Köhler, .: Über den Stand der Frage von der Übertragbarkeit der Rindertuberkulose auf den Menschen. Vortrag, gehalten auf der Internationalen Tuberkuloseconferenz zu Berlin am 25.10.1902. Dtsch. Med. Wschr. 28: 801-803 (1902)

Konno, K. New chemical method to differentiate human-type tubercle bacilli from other mycobacteria. Science 124: 985 (1956)

Eine neue Methode zur Identifizierung des Tuberkelbacillus Typus humanus.
I. Nicotinsäureproduktion der Mycobakterien, die in synthetischen, flüssigen Nährböden gezüchtet werden.
II. Die Produktion von Nicotinsäure durch Mycobakterien, welche auf festen Nährböden gezüchtet wurden.
III. Eine weitere Verbesserung durch Verwendung des flüssigen Dubos Tween Albumin Nährmediums.
Beitr. Klin. Tuberk. 119: 1-13 (1958)

Konno, K., Kurzmann, R. and Bird, K.T. The metabolism of nicotinic acid in mycobacteria. A method for differentiating tubercle bacilli of human origin from other mycobacteria. Am. Rev. Tuberc. 75: 529-537 (1957)

Konno, K., Kurzmann, R., Bird, K.T. and Sbarra, A. Differentiation of human tubercle bacilli from atypical acid-fast bacilli.
I. Niacin production of human tubercle bacilli and atypical acid-fast bacilli.
Am. Rev. Tuberc. 77: 669-674 (1958)

Konno, K., Nagayama, H. and Oka, S. Nicotinamidase in mycobacteria. A method for distinguishing bovine-type tubercle bacilli from other mycobacteria.
Nature London 184: 1743-1744 (1959)

Konno, R. and Sbarra, A. Differentiation of human tubercle bacilli from atypical acid-fast bacilli. Am. Rev. Tuberc. 79: 810-812 (1959)

Kossel, H. Die Tuberkelbacillen.
Handbuch der path. Mikroorg., 2. Aufl., Bd. V, Seite 391-480
Gustav Fischer-Verlag Jena 1913

Lange, L. Allgemeines zum Problem der Tuberkulose und Sauerstoff.
Beitr. Klin. Tuberk. 68: 680-685 (1928)

Lebek, G. Die Brauchbarkeit des Wagener'schen Bromkresolpurpur-Nährbodens für die Typenbestimmung des Mycobacterium tuberculosis.
Zbl. Bakt. I. Orig. 161: 324-327 (1954)

Über den Nachweis des unterschiedlichen Sauerstoffoptimums des humanen und bovinen Mycobacterium tuberculosis.
Zbl. Bakt. I. Orig. 173: 581-587 (1958)

Beitrag zur kulturellen Unterscheidung von säurefesten saprophytischen Mykobakterien und Tuberkelbakterien aus menschlichen Ausscheidungen.
Zbl. Bakt. I. Orig. 174: 265-277 (1959) a

Über die Brauchbarkeit des Niazintestes für die Typendifferenzierung der beiden Säugetiertypen des Mycobacterium tuberculosis.
Med. Mschr. 13: 300-303 (1959) b

Die Abhängigkeit des Sauerstoffoptimums der beiden Säugetiertypen des Mycobacterium tuberculosis von den angebotenen Nährstoffen.
Zbl. Bakt. I. Orig. 176: 530-537 (1959) c

Lisboa, B. P. Quantitative Bestimmung von Nicotinamid (NA) in Gegenwart von Nicotinsäure (NS).
Naturwiss. 44: 617-618 (1957)

Marek, A. Über die Brauchbarkeit des Niacin-Testes bei der Typendifferenzierung von Mycobakterien.
Beitr. Klin. Tuberk. 117: 529-536 (1957)

Meissner, G. Zur Frage der Virulenz chemoresistenter Tuberkelbakterien.
Beitr. Klin. Tuberk. 113: 62-74 (1955)

Eigenschaften der unter INH-Behandlung der Patienten selektionierten Tuberkelbakterien.
Jahresbericht Tuberkulose-Forschungsinstitut Borstel 1956/57, Seite 510-585
Springer-Verlag Berlin, Göttingen, Heidelberg 1957

Tuberkelbakterien vom Typus bovinus beim Menschen in den Jahren 1953-1957.
Tuberk. Arzt 13: 74-90 (1959) a

Meissner, G. Untersuchungen an atypischen Mycobakterien. Beitr. Klin. Tuberk. 120 : 377-387 (1959) b

Schwierigkeiten und Möglichkeiten bei der Typendifferenzierung humaner und boviner Tuberkelbakterien. Tuberk. Arzt 15 : 151 - 160 (1961)

Meissner, G. und Bönicke, R. Die Beziehungen zwischen Katalase-Inaktivierung, Sensibilitätsminderung für INH und Virulenzschädigung für das Meerschweinchen. Beitr. Klin. Tuberk. 116 : 501-514 (1957)

Middlebrook, G. Isoniacid-resistance and catalase activity of tubercle bacilli. A preliminary report. Am. Rev. Tuberc. 69 : 471-472 (1954)

Moeller, A. Zur Frage der Übertragbarkeit der Menschentuberkulose auf Rinder und Ziegen. Dtsch. Med. Wschr. 28 : 718-719 (1902)

Möllers, B. Die Tuberkelbacillen. Handbuch der path. Mikroorg., 3. Aufl., Bd. V, 2, Seite 615-709, Gustav Fischer-Verlag, Jena Urban-Schwarzenberg-Verlag Berlin, Wien 1928

Nassal, J. Experimentelle Untersuchungen über die Isolierung, Differenzierung und Variabilität der Tuberkulosebakterien. Beiheft 2 zum Zbl. Vet. Med. Verlag Paul Parey 1961

Oginsky, E.L. and Umbreit, W.W. An introduction to bacterial physiology. Seite 17 W. H. Freeman and Company, San Francisco 1954

Peknice, J.R. Spektrophotometrische Bestimmung der Nikotinsäure durch Chloramin T. Ref. i. Chem. Zbl. 127 : 5654 (1956)

Pope, H. and Smith, D.T. Synthesis of B-complex vitamins by tubercle bacilli when grown on synthetic media. Am. Rev. Tuberc. 54 : 559-563 (1946)

Roth, W., Carrara, G. und Erlenmeyer, H. Über die tuberkulostatischen Eigenschaften des Thiophen-2-carbonsäurehydrazids. Helv. Chim. Acta 36 : 1004-1007 (1953)

Russell, J.A. The colorimetric estimation of small amounts of ammonia by the phenol-hypochlorite reaction. J. Biol. Chem. 156 : 475-461 (1944)

Smith, Th. A comparative study of bovine tubercle bacilli and of human bacilli from sputum. J. Exp. Med. Vol. III Nr. 4 und 5 (1898) zit. b. Beck und Möllers

Stickl, O. und Knapp, W. Bakteriologie und Immunologie der Tuberkulose. In: Die Tuberkulose. Ihre Erkennung und Behandlung. Herausgeber: Deist, H. und Krauss, H. Ferdinand Enke-Verlag Stuttgart 1959

Stottmeier, D. Untersuchungen über die Eignung des Phenolrot- und des Phenolrot-Malachitgrün-Nährbodens zur Typendifferenzierung von Mycobakterien. Zbl. Bakt. I. Orig. 187 : 524-532 (1962)

Stur, D. Der Bromkresolpurpurnährboden in der praktischen Typenbestimmung von Tuberkelbakterien. Acta Path. Microbiol. Scand. 37 : 279-285 (1955)

Tirunarayanan, M.O. and Vischer, W.A.: Effect of Isoniacid on Catalase and Peroxadase of Tubercle Bacilli in vitro. Naturwiss. 43 : 474-475 (1956)

Relationship of isoniacid to the metabolism of mycobacteria. Catalase and Peroxydase. Am. Rev. Tuberc. 75 : 62-70 (1957)

Virtanen, S. A study of nitrate reduction by mycobacteria. The use of the nitrate reduction test in the identification of mycobacteria. Acta Tuberc. Scand. Suppl. 48 : 1-119 (1960)

Vischer, W.A. Neuere Methoden zur Differenzierung von humanen und bovinen Tuberkelbakterien. Path. Microbiol. 24 : 741-751 (1961)

Vischer, W.A. und Tirunarayanan, M.O. Die Bedeutung der Peroxydaseaktivität bei Mykobakterien. Schweizer. Zschr. Tuberk. 14 : 243-246 (1957)

Wagener, K. und Mitscherlich, E. Zwei neue Nährböden zur kulturellen Differenzierung der Tuberkelbakterientypen. Tuberk. Arzt 5 : 274-283 (1951) a

Wagener, K. und Mitscherlich, E. Fortschritte in der kulturellen Differenzierung der Tuberkelbakterientypen. Zbl. Bakt. I. Orig. 157 : 87-94 (1951) b

Wagener, K., Thiel, W. und Hensel, L. Das Kletter-Phänomen, ein kulturelles Art- und Typenmerkmal der Tuberkelbakterien. Zbl. Bakt. I. Orig. 167 : 291-297 (1956)

Weber, A. Zur Tuberkulose des Menschen und der Tiere. Festschrift für Löffler, F. Zbl. Bakt. I. Orig. 64 : 243-256 (1912)

Wolters, K. L. und Dehmel, H. Zur Züchtung und Differenzierung der Tuberkelbazillen. II. Mitteilung Zbl. Bakt. I. Orig. 117 : 412-419 (1930)

Lebenslauf

Ich, Werner Runge, wurde am 17. Juni 1935 als erstes Kind des Apothekers Hans Runge und seiner Gattin Charlotte, geb. Rietz in Zerbst geboren. Von 1941 - 1949 besuchte ich die Zentralschule in Lindau/Anhalt und von 1949 - 1953 die Oberschule in Barby/Elbe. Da mehrere Bewerbungen um einen Studienplatz an den Universitäten der DDR fehlschlugen, ging ich von 1953 bis 1954 an die Medizinische Fachschule in Dessau-Alten und erhielt nach einem praktischen Jahr an den dortigen Krankenanstalten 1955 die staatliche Anerkennung als Krankenpfleger. Bis 1957 arbeitete ich dann im Kreiskrankenhaus in Zerbst. Im Frühjahr 1958 legte ich nach dem Besuch eines halbjährigen Kurses in Tübingen die Ergänzungsprüfung zum Ostabitur ab. Ich ließ mich dann im Sommersemester 1958 an der Universität Tübingen immatrikulieren, wo ich nach dem Sommersemester 1960 die ärztliche Vorprüfung und am 22.12.1964 das ärztliche Staatsexamen bestand.

Fotodruck Frau Elly HUTH Tübingen